

Die Regulation des humanen Lipopolysaccharid Bindenden Proteins (hLBP)

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Werner Hallatschek

geboren am 03.10.1961 in Öhringen (Baden-Württemberg)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Thomas Buckhout

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ralf Schumann
2. Prof. Dr. Richard Lucius
3. Prof. Dr. Dr. Ernst Rietschel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2004

Abstrakt

Das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP) ist ein überwiegend in der Leber synthetisiertes Akutphaseprotein. Es bindet den Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien und transportiert es zu zellulären Rezeptoren, wodurch das angeborene Immunsystem aktiviert wird.

In dieser Arbeit wird die Regulation der LBP-Expression in Interleukin (IL)-1, IL-6 und Dexamethason (Dex) stimulierten humanen Hepatomzelllinien HuH-7 und HepG2 untersucht. Der wichtigste Stimulator ist dabei IL-6, dessen Wirkung über die Transkriptionsfaktoren (TF) Stat-3, C/EBP-beta und AP-1 vermittelt wird. Für alle 3 TF konnten aktive Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor nachgewiesen werden. Für IL-1-Effekte die u. a. über den TF NF-kappaB vermittelt werden, konnten ebenfalls aktive Bindungsstellen nachgewiesen werden. Die Wirkung von Dex wird über Glucocorticoid Responsive Elements (GREs) vermittelt. Auf dem LBP-Promotor befinden, sich wie gezeigt werden konnte, mehrere aktive GREs, wobei einige verstärkend und einige hemmend wirken. Eine zu beobachtende Synergiewirkung von Dex und IL-6 wird durch die Aufregulation des IL-6-Rezeptors durch Dex verursacht.

Die LBP-Expression kann durch TGF (Transforming Growth Factor)-beta gehemmt werden. Der TGF-beta-Signalweg über Smads ist in den Hepatomzellen aktiv, vermittelt aber nicht den TGF-beta-Hemmeffekt, sondern eine geringe stimulierende Wirkung, die bei alleiniger TGF-beta-Inkubation auftritt. Die inhibierende Wirkung von TGF-beta wird durch Gfi-1- und AP-1-Bindungsstellen vermittelt. Die Gfi-1-Bindungsstelle nimmt dabei, wie hier erstmals gezeigt werden konnte, eine herausragende Stellung ein.

Die Aufklärung der LBP-Regulation und dabei besonders die Hemmung der LBP-Expression kann mittelfristig dazu beitragen, den klinischen Verlauf von inflammatorischen und infektiösen Erkrankungen zu beeinflussen und bietet daher Potenzial für neue Therapieansätze.

Schlagworte

LPS binding protein (LBP)
Lipopolysaccharid (LPS)
Interleukin-6 (IL-6)
Dexamethason (Dex)
Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta)
Aktivatorprotein-1 (AP-1)
(C)CAAT/enhancer binding protein-beta (C/EBP-beta)
Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat-3)
Nuclear factor kappa B (NF kappa B)
Glucocorticoid responsive element (GRE)
Growth factor independence-1 (Gfi-1)

Abstract

Lipopolysaccharide (LPS) binding protein (LBP) is an acute phase protein with the ability to bind and transfer LPS of Gram-negative bacteria. This soluble pattern recognition molecule represents an important defense principle of the host. Regulation of the hepatic acute phase response and its termination are important mechanisms for limiting systemic inflammatory activity of the host.

Here we analyze the cooperation of Interleukin (IL)-1, IL-6, and Dexamethasone (Dex) at LBP expression in the hepatoma cell lines HuH-7 and Hep G2. The major inducer of LBP expression is IL-6. Within the LBP promoter numerous highly consensus binding sites such as AP-1, C/EBP- β and STAT3 are present, that confer transcriptional activity as shown by truncation and mutation experiments. Additionally, activate NF-kappaB sites activated by IL-1 were detected at the LBP promoter.

By mutation experiments of the promoter furthermore were found differentially active glucocorticoid response elements (GREs). The promoter contains GREs enhancing the activity as well as inhibitory ones. The enhancing effect towards LBP expression by Dex was mediated by IL-6. Dex stimulated the expression of the IL-6 receptor and therefore upregulated the IL-6 pathway.

Transforming Growth Factor (TGF)- β is able to inhibit LBP expression in stimulated cells. An AP-1 binding site was identified mediating inhibitory TGF- β effects towards LBP promoter activity. Furthermore it was shown that a growth factor independence (Gfi)-1 binding site localized near the AP-1 site is essential for mediating the TGF- β inhibitory effect. The relevancy of the Gfi-1 site for mediating TGF- β effects indicates a novel mechanism for understanding inhibitory TGF- β effects at the transcriptional level.

In summary the complex regulation of LBP were elucidate which may help to eventually develop novel intervention strategies for acute phase, sepsis, and septic shock.

Keywords

LPS binding protein (LBP)
lipopolysaccharid (LPS)
interleukin-6 (IL-6)
dexamethasone (Dex)
transforming growth factor beta (TGF- β)
activator protein-1 (AP-1)
(C)CAAT/enhancer binding protein-beta (C/EBP- β)
signal transducer and activator of transcription 3 (Stat-3)
nuclear factor kappa B (NF kappa B)
glucocorticoid responsive element (GRE)
growth factor independence-1 (Gfi-1)

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Das Immunsystem	1
1.1	Die angeborene Immunantwort	1
1.2	Die adaptive Immunantwort	2
1.3	Lipopolysaccharid (LPS)	2
1.4	Lipopolysaccharid Bindendes Protein	4
1.5	CD14, Toll-like Rezeptoren und MD-2	5
1.6	Die Akutphasereaktion	7
1.7	Sepsis und septischer Schock	8
2	Zytokine und Glukokortikoide	9
2.1	IL-6	9
2.2	IL-1	10
2.3	TNF- α	11
2.4	Dexamethason	11
2.5	IL-10	12
2.6	TGF- β	12
3	Regulation der Genexpression	13
3.1	Grundlagen der transkriptionellen Aktivierung	13
3.2	AP-1	14
3.3	C/EBP	15
3.4	Stat	15
3.5	NF- κ B	16
3.6	Smads	16
3.7	Gfi-1	17
3.8	GRE und andere GR-bindende DNA-Regionen	17
3.9	Posttranskriptionelle Regulation	17
4	Zielstellung der Arbeit	19
II	Material und Methoden	20
1	Kultur eukaryotischer Zellen	20
1.1	Nährlösungen, Zusätze und Zelllinien	20
1.2	Kultivierung	20
1.3	Mycoplasmen	20
1.4	Stimulation der Zelllinien	21
2	Arbeiten mit E. coli Bakterien	21
2.1	Plasmide und Bakterienkultur	21
2.2	Transformation	21
2.3	Präparation von Plasmid-DNA	22
2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
2.5	Restriktionsspaltung von DNA	22
2.6	Elektrophoretische Auftrennung der DNA	22
3	Luciferase Reporter-gen-Assay	23
3.1	Transfektion	23
3.2	Luciferase- und β -Galaktosidasemessung	23
3.3	Auswertung	24
4	Mutation des LBP-Promotors	24
4.1	Auswahl der zu mutierenden DNA-Sequenzen	24
4.2	Kriterien der Mutation und Übersicht	25
4.3	Mutationsassay	25
4.4	Probeverdau mit Restriktionsenzymen	28
5	EMSA	29
5.1	Zellkultur und Stimulation	29
5.2	Isolierung nukleärer Proteine	29
5.3	Hybridisierung und Markierung der Oligonukleotide	30
5.4	DNA-Protein-Inkubation, Gellauf und Visualisierung	30

6	LBP-ELISA	31
6.1	Zellkultur und Zellstimulation	31
6.2	Durchführung des ELISA	32
7	Northern-Blot Analyse und RT-PCR	32
7.1	Zellkultur und Zellstimulierung	32
7.2	Isolierung der RNA	33
7.3	Gelelektrophorese der RNA	33
7.4	Übertragen der RNA auf eine Nylonmembran („blotten“)	33
7.5	Herstellung der cDNA-Sonde	34
7.6	Radioaktive Markierung der Sonde	34
7.7	Hybridisierung von RNA und Sonde	34
7.8	Mehrfachhybridisierung	35
7.9	Reverse Transkription (RT)-PCR	35
8	Western-Blot-Analyse und p44/42-Kinase-Assay	36
8.1	Zellkultur und Zellstimulierung	36
8.2	Isolierung der zytoplasmatischen Proteine	36
8.3	Gel und Gellauf	37
8.4	„Blotten“ und Detektion	37
8.5	Strippen, neue Antikörperbindung	38
8.6	p44/42-Kinase-Assay	38
9	FACS-Messungen	39
9.1	Zellkultur und -stimulierung	39
9.2	Antikörperinkubation und Fixierung	39
9.3	Messung und Auswertung	39
10	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	40
III	Ergebnisse	41
1	Die Wirkung von IL-1, IL-6, Dex und TNF- α auf die LBP-Expression	41
1.1	Der Einfluss von IL-1, IL-6 und Dex auf Transkription, RNA-Akkumulation und LBP-Synthese	41
1.2	Die Wirkung von TNF- α auf die Aktivität des LBP-Promotors	43
1.3	Kotransfektion verschiedener C/EBP-Varianten in Hepatomzellen	44
1.4	Mutation von potentiellen C/EBP- β - und Stat-3-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor	46
1.5	Die Rolle von AP-1-Bindungsstellen im LBP-Promotor	47
2	Die Vermittlung der IL-1-Effekte auf die LBP-Expression	49
2.1	IL-1-Effekte in der Signaltransduktion von Hepatomzellen	49
2.2	Der NF- κ B-Signalweg in Hepatomzelllinien	50
2.3	Die Aktivierbarkeit des LBP-Promotors durch p65	52
2.4	NF- κ B-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor	52
3	Die Ursachen der Dexamethason-Wirkung auf die LBP-Expression	54
3.1	Dex-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor	54
3.2	Die Wirkung von NF-IL6-Vektoren auf die Dex-Aktivität	55
3.3	Der Einfluss von Dex auf die Expression des IL-6-Rezeptors und von gp130	56
3.4	Die Wirkung von Dex auf den IL-6-induzierbaren Stat-Signalweg	57
4	Die Wirkung von IL-10 und TGF- β 1 auf die LBP-Expression	59
4.1	Analyse von IL-10-Effekten auf die LBP-Expression	59
4.2	Die Wirkung von TGF- β 1 auf die LBP-Proteinkonzentration in Kulturüberständen	60
4.3	LBP-Promotoraktivität in stimulierten Hepatomzellen nach TGF- β 1-Inkubation	62
5	Smad- und AP-1-Bindungsstellen bei der Vermittlung der TGF- β 1-Wirkung	63
5.1	Smad-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor	63
5.2	Lokalisation der TGF- β 1-Hemmeffekte auf dem LBP-Promotor	66
5.3	Mediation des TGF- β 1-Hemmeffekts durch die AP-1-Bindungsstelle -540 bp	69
6	Die Funktion von Gfi-1 bei der Vermittlung des TGF- β 1-Hemmeffektes	71
6.1	Analyse der Gfi-1-Bindungsstelle bei -556 bp	71
6.2	Die Wechselwirkung der Gfi-1-, AP-1- und NF- κ B-Bindungsstellen	73
6.3	Der Einfluss weiterer Gfi-1-Bindungsstellen auf den LBP-Promotor	75
6.4	Kotransfektion eines pGfi-1-Expressionsvektors in die Hepatomzellen	76
6.5	Die Wirkung der pGfi-1 Mutanten pGfi-1 ^{Zn+} und pGfi-1 ^{Zn-} auf den LBP-Promotor	77
6.6	Gfi-1-Expression in der Hepatomzelllinie HepG2	78

6.7	LBP-Serumkonzentrationen in Gfi-1-Knockout-Mäusen	79
7	Die Expression von LBP in der Lungenepithelzelllinie A-549	80
8	Übersicht der Ergebnisse	82
IV	Diskussion	84
1	Die Aktivierung der LBP-Expression	85
1.1	IL-6 als Hauptinduktor der LBP-Expression	85
1.2	Die IL-1-Wirkung: Der NF- κ B-Signalweg und die Synergie mit IL-6	86
1.3	Die Vermittlung der Dex-Effekte und der Synergieeffekt von IL-6 und Dex	88
2	Die Hemmung der LBP-Expression	91
2.1	Die Wirkung von TGF- β 1 auf die LBP-Expression	91
2.2	Gfi-1 als regulatorisches Element des LBP-Promotors	93
2.3	Die Inhibierung aktiver Promotoren	94
3	Klinische Bedeutung von LBP und seiner Regulation	98
V	Zusammenfassung	99

I EINLEITUNG

1 Das Immunsystem

Höhere Vertebraten haben verschiedenartige Mechanismen entwickelt, um sich gegen allgegenwärtige Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten zu schützen. Sie verfügen über eine angeborene Immunantwort („innate immunity“) und eine erworbene Immunität („adaptive immunity“). Das phylogenetisch jüngere erworbene Immunsystem es entstand vor etwa 450 Millionen Jahren und erlaubt die Wiedererkennung des Krankheitserregers bei einer Neuinfektion; dadurch kann es selektiv auf den Erreger reagieren. Das angeborene Immunsystem hingegen, das in verschiedenen Formen in allen mehrzelligen Organismen zu finden ist, ist unveränderlich und weniger spezifisch, kann aber unmittelbar auf die Pathogene reagieren. Der wesentliche Unterschied dieser beiden Formen der Abwehr liegt im Mechanismus der Pathogenerkennung, wobei den beteiligten zellulären Rezeptoren eine besondere Bedeutung zukommt [1, 2].

1.1 Die angeborene Immunantwort

Ist es einem Krankheitserreger gelungen, in den Wirtsorganismus einzudringen, wird dieser durch die unmittelbare angeborene Immunreaktion mit Hilfe von Gewebsmakrophagen und neutrophilen Granulozyten, antimikrobiellen Peptiden und dem Komplementsystem bekämpft [3]. Als erster Schritt muss dabei der Erreger als solcher vom Immunsystem erkannt werden. Dazu steht jedoch bei der angeborenen Immunantwort nur eine begrenzte Anzahl an genetisch festgelegten Rezeptoren zur Verfügung. Dem gegenüber steht die sehr heterogene und zahlenmäßig äußerst umfangreiche Gruppe der Krankheitserreger, die zudem meist noch eine hohe Mutationsrate aufweisen. Daher ist ein wichtiges Prinzip der angeborenen Immunität, nicht jedes mögliche Antigen, sondern nur wenige, hoch konservierte Antigenstrukturen zu erkennen [4]. Diese durch den kürzlich geprägten Terminus „pathogenassoziierte molekulare Muster“ („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs) bezeichneten Moleküle sind beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykane (PG), Lipoteichonsäuren (LTA), Mannane, Glykane, bakterielle DNA und doppelsträngige RNA [4, 5, 6]. Diese Strukturen sind chemisch sehr unterschiedlich, weisen aber bestimmte Gemeinsamkeiten auf: Sie werden nur von Mikroorganismen und nicht vom Wirt gebildet, sie sind essentiell für die Pathogenität oder das Überleben des Mikroorganismus und sie kommen bei einer großen Anzahl der Pathogene vor [2, 4]. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die solche Strukturen erkennen, werden als mustererkennende Rezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs) bezeichnet und werden auf verschiedenen antigenpräsentierenden Effektorzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert [7, 8]. Die einzelnen Rezeptortypen sind dabei auf verschiedenen dieser Zelltypen zu finden, so dass der Krankheitserreger gleichzeitig verschiedenen zellspezifischen Immunantworten ausgesetzt wird. Die Antwort der Zellen erfolgt im Gegensatz zur Antwort des adaptiven Immunsystems sehr schnell, ohne dass die Zellen zuvor proliferieren [4].

1.2 Die adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunität wird hauptsächlich durch T- und B-Lymphozyten vermittelt. Jede Zelle trägt dabei im ungeprägten Zustand nur Rezeptoren einer einzigen Spezifität, die sich von allen anderen Zellen unterscheidet. Die dafür benötigte, fast unbegrenzte Vielfalt an Rezeptoren wird durch einen einzigartigen genetischen Mechanismus erreicht, der während der Entwicklung dieser Zellen im Knochenmark und im Thymus abläuft. Dabei wird die variable Region der Rezeptoren durch die in jeder Zelle individuelle Kombination der sogenannten V-, D- und J-Gensegmente gebildet (somatische Rekombination). Bei der darauf folgenden somatischen Selektion werden autoreaktive Lymphozyten eliminiert und relevante Effektorzellen ausgewählt [9].

Bei der angeborenen Immunität existieren nur wenige, konservierte PRRs, die im Laufe der Evolution ausgebildet und selektiert wurden und gemeinsam auf einer Zelle exprimiert werden können. Im Gegensatz dazu steht die adaptive Immunität, die eine enorme Anzahl an Rezeptorvariationen hervorbringt, welche nicht auf einer Zelle kombiniert werden. Dabei erfolgt sowohl die Bildung als auch die Selektion der Rezeptoren somatisch [10].

Die Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen benötigt kostimulierende Faktoren, wobei die Induktion der kostimulierenden Moleküle B7.1 und B7.2 erst nach Erkennung von PAMPs durch PRRs erfolgt. Diese Rückversicherung bei der angeborenen Immunität scheint bedeutend für die Vermeidung von Immunität gegen Autoantigene und nichtpathogene Umweltantigene zu sein. So könnten Autoimmunkrankheiten und Allergien zum Teil auf Störungen dieser Mechanismen zurückzuführen sein [4]. Die Antigenpräsentation auf MHC („major histocompatibility complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex)-II-Molekülen und die gleichzeitige Expression kostimulierender Moleküle bewirkt die Aktivierung und klonale Proliferation der zu diesem Antigen passenden nativen CD4-T-Lymphozyten, die für die Aktivierung der B-Zellen, der CD8-T-Zellen und weiterer Makrophagen benötigt werden [11].

1.3 Lipopolysaccharid (LPS)

Eines der wichtigsten und am meisten untersuchten PAMPs ist das Lipopolysaccharid (LPS). Es ist ein integraler und essentieller Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Die Namensgebung Lipopolysaccharid verweist auf die chemische Struktur von LPS; es besteht aus einem hydrophilen Polysaccharidanteil und einem hydrophoben Lipid A (Abb. 1). Auf Grund ihres amphipatischen Charakters lagern sich die LPS-Moleküle in wässrigen Lösungen, wie z.B. Serum, zu supramolekularen Aggregaten zusammen und bilden sogenannte Mizellen [12]. Eine Untereinheit des LPS, das Lipid A, wurde in den 50er und 60er Jahren chemisch charakterisiert und später als der biologisch aktive Anteil des LPS erkannt. Das Lipid A ist die am wenigsten variable Komponente im LPS und verankert es in der bakteriellen Zellmembran [13, 14, 15]. Inzwischen ist die Gesamtstruktur von LPS verschiedener Bakterienarten aufgeklärt [16, 17, 18].

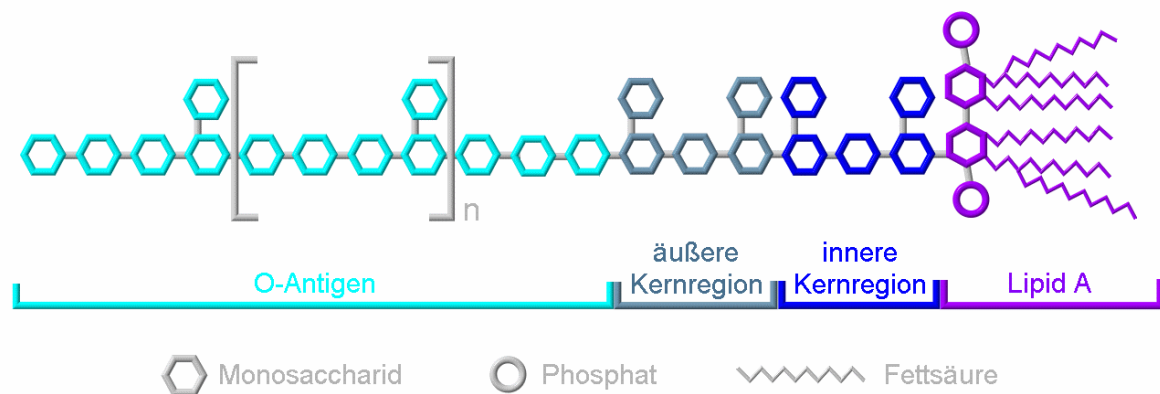


Abb. 1: Chemische Struktur von LPS

LPS besteht aus dem Polysaccharidanteil (O-Antigen, äußere Kernregion, innere Kernregion) und Lipid A. Das O-Antigen wird aus bis zu 50 (n) Oligosacchariden, die sich aus drei bis acht verschiedenen Einzelzuckern zusammensetzen, gebildet. Der äußere Kern enthält die häufig vorkommenden Saccharide Glukose, Galaktose, Glukosamin und Galaktosamin, während der innere Kern den in der Natur selten synthetisierten Zucker Ketodesoxyoctonsäure (Kdo) und Heptosereste, die phosphoryliert sein können, enthält. Das Grundgerüst des Lipid A ist ein phosphoryliertes Glukosamindisaccharid, welches vier Fettsäurereste trägt, von denen zwei wiederum sekundär acyliert sind.

Die historische Bezeichnung für LPS lautet Endotoxin. Sie ist in doppelter Weise irreführend, da es erstens nicht in den Bakterien vorliegt und zweitens im pharmakologischen Sinn kein Gift darstellt. Dieser Name beschreibt aber indirekt die Eigenschaften eines PAMPs: Endotoxin ist ein integraler, evolutionär stark konservierter Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und wird hauptsächlich bei Zellteilung oder Lyse der Bakterien freigesetzt. Da LPS von den Bakterien nicht aktiv abgegeben wird, wurde es als endogener Stoff verstanden und den Exotoxinen, die sezerniert werden, gegenüber gestellt [19]. Endotoxin oder LPS ist eine der stärksten bioaktiven Substanzen überhaupt; es ruft im Organismus schon bei niedrigsten, pikomolaren Konzentrationen heftige Immunreaktionen hervor, wie z.B. Zytokinfreisetzung, Adhäsionsmolekülsynthese, Phagozytose, Sauerstoffradikalfrei-setzung, Fieber, Komplement-Aktivierung, Aktivierung von Makrophagen und die Stimulation von B-Lymphozyten [20, 21]. Das vermeintliche Toxin LPS, im engeren Sinn kein Gift, löst systemische Alarmreaktionen aus, die somit primär lediglich der Infektionsabwehr dienen.

Die meisten als PAMPs im Wirtsorganismus wirksamen bakteriellen Substanzen sind Elemente der Zellwandmatrix der Bakterien. Bei Gram-positiven Bakterien sind es hauptsächlich Vertreter der Stoffklasse der Peptidoglykane (PGN) und Lipoteichonsäuren (LTA), bei den Gram-negativen Erregern das LPS. Vom klinischen Erscheinungsbild der Bakteriämie her besteht kein Unterschied zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Infektionserregern, was auf ähnliche Erkennungsmechanismen und Wirts-Reaktionsmuster schließen lässt [22].

1.4 Lipopolysaccharid Bindendes Protein

LPS ist im Serum größtenteils an Lipoprotein hoher Dichte („High Density Lipoprotein“, HDL) - Partikel gebunden. Dieser Komplex weist eine Dichte von 1,21 g/ml auf. Tobias entdeckte 1984 einen Komplex von höherer Dichte (1,3 g/ml), der aus LPS und einem zu diesem Zeitpunkt unbekannten Protein bestand. Dieses Protein erhielt den Namen LBP (Lipopolysaccharid Bindendes Protein) [23]. LBP ist ein 60 kD Glykoprotein, das aus 452 Aminosäuren inklusive einer 25 Aminosäuren langen Signalfrequenz besteht und als Akutphaseprotein (APP) hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird [24, 25]. Zusätzlich konnte die Expression von LBP in Lungenepithelzellen Typ II und in Darmepithelzellen nachgewiesen werden [26, 27]. Die Konzentration von LBP steigt von einem konstitutiven Serumspiegel von 5-15 µg/ml auf 30 bis über 100 µg/ml in der Akutphase der Sepsis [28, 29].

Wie bereits beschrieben, bildet LPS Mizellen aus, welche sehr stabile Aggregate darstellen und aus denen nur sehr langsam und in geringem Umfang einzelne LPS-Moleküle dissoziieren. Entsprechend hat in Mizellen gebundenes LPS in geringer Konzentration kaum immunostimulatorische Wirkung, in hoher Konzentration jedoch können einige Zellarten in vitro stimuliert werden. Geringe, physiologisch relevante LPS-Konzentrationen wirken in der Zellkultur nur stimulatorisch, wenn Plasma hinzugegeben wird [30, 31]. Dieser verstärkende Effekt wird durch das im Serum befindliche LBP und das lösliche CD14 (sCD14) vermittelt. LBP, ein Lipidtransferprotein, fördert dabei das Herauslösen von LPS aus Mizellen und den Transport von monomerem LPS an humorale oder zelluläre Bindungsstellen [32, 33]. An CD14-positiven Zellen wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von LBP 1000-fach geringere LPS-Konzentrationen notwendig sind, um eine Zytokinausschüttung hervorzurufen [24].

Neben LBP gibt es noch weitere strukturell verwandte LPS-Bindungs- und Lipid-Transfer-Proteine: Bactericidal/Permeability Increasing Protein (BPI), Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) und Phospholipid Transfer Protein (PLTP). Diese Proteine zeigen einen hohen Grad an struktureller und funktioneller Übereinstimmung mit LBP, so dass sie zu einer Proteinfamilie zusammengefasst werden. Alle Mitglieder dieser Familie binden Lipidstrukturen oder katalysieren den Austausch von Lipiden zwischen Mizellen und Rezeptor [34, 35]. Zwischen LBP und BPI besteht mit 45% die größte Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz [36]. BPI bindet ebenfalls an das LPS Gram-negativer Bakterien, aber im Gegensatz zu LBP besitzt es auch bakterizide Eigenschaften, es permeabilisiert die Zellmembran und zerstört dadurch die Bakterien. Dieser zytotoxische Effekt wird durch LBP verstärkt; die stimulatorischen Eigenschaften von LBP werden jedoch von BPI abgeschwächt [37].

Der LBP-vermittelte Transfer von LPS-Monomeren erfolgt in einem zweistufigen Prozess. Im ersten Schritt wird LPS auf sCD14 übertragen, beim zweiten Schritt wird LPS an einen zellulären Rezeptor oder an einen anderen Akzeptor übertragen. So kann LPS LBP-katalysiert auf Lipoproteine oder Phospholipidvesikel übertragen werden, was zu einer Detoxifizierung von LPS führt [38, 39].

Ferner vermittelt LBP auch die Internalisierung von LPS durch Phagozyten ohne Zellaktivierung [40]. Analysen mit Peptiden, die eine Region aus LBP und BPI mit analogem Hydrophobizitätsmuster repräsentieren, und Mutageneseuntersuchungen an LBP haben identische Ergebnisse erbracht, nämlich dass LBP und BPI LPS innerhalb einer Peptidsequenz zwischen Aminosäuren 86 und 104 erkennen [32], Abb. 2).

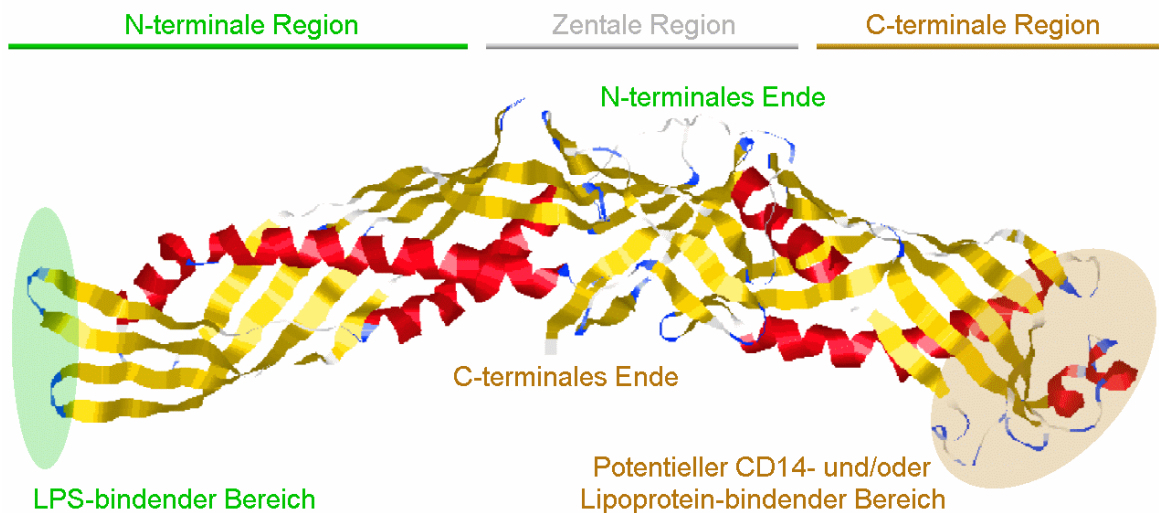


Abb. 2: Computersimulation der LBP-Struktur

Das 3-dimensionale Modell der potentiellen LBP-Struktur basiert auf kristallografischen Daten des verwandten BPI. Demnach hat LBP eine bumerangartige Form. Vom N-terminalen Ende her, das sich hier in der Abbildung in der Mitte oben befindet, verläuft die Aminosäurekette zunächst nach links. In dieser N-terminalen Region befindet sich der LPS-bindende Bereich. Rechts in der C-terminalen Region befinden sich wahrscheinlich die Bindungsstellen für CD14 und/oder der Lipoprotein-bindende Bereich. Das C-terminale Ende befindet sich in der Mitte unten [41].

LBP-Serumkonzentrationen, die während der Akutphase vorkommen, hemmen die immunstimulatorischen Wirkungen von Bakterienbestandteilen. Daher wird LBP neben der verstärkenden Wirkung bei der LPS-Erkennung auch eine detoxifizierende Wirkung zugeschrieben [29, 42, 43].

Wie neuere Untersuchungen zeigen, ist LBP auch an der Erkennung von Gram-positiven Bakterien beteiligt, so u.a. von *Bacillus subtilis* und *Streptococcus pneumoniae* [44]. Dabei ist unter anderem LTA ein PAMP, das von LBP erkannt wird. Auch hier hat LBP eine entscheidende Funktion bei der Erkennung von LTA, so dass unter Anwesenheit von LBP schon geringe Mengen LTA ausreichen, um in vitro eine immunstimulatorische Wirkung auszulösen [45, 46].

1.5 CD14, Toll-like Rezeptoren und MD-2

Es sind verschiedene LPS-erkennende Rezeptoren beschrieben worden: Zum einen der Komplementrezeptor 3 (CR3), der oberflächengebundenes LPS wie es z.B. bei lebenden *E. coli* vorliegt, erkennt und dadurch Phagozytose vermittelt [47]. Der sogenannte „Scavengerrezeptor“ vermag LPS zu erkennen und nach LPS-Bindung die Internalisierung des Ligand-Rezeptor-

Komplexes und dadurch die Detoxifizierung einleiten [48, 49]. Die wichtigsten zellulären Rezeptoren sind jedoch CD14 und die erst kürzlich entdeckten Toll-like Rezeptoren (TLRs).

CD14 kommt sowohl in löslicher (sCD14) als auch in membranständiger Form (mCD14) vor. Es ist vorwiegend auf Monozyten, Makrophagen und aktivierten Granulozyten zu finden [50]. Wrigth et al. konnten 1990 zeigen, dass die Aktivierung von Makrophagen mittels LPS durch anti-CD14-Antikörper blockiert werden kann und demnach CD14 an der LPS-Erkennung beteiligt ist [31]. Neben der LPS-Erkennung ist CD14 auch an der Identifizierung von Zellwand- oder Zellmembranbestandteilen von Gram-positiven Bakterien und Mykobakterien, z.B. Peptidoglykan, Lipoteichonsäure und Lipoarabinomannan beteiligt [46]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird CD14 zu den PRRs der angeborenen Immunität gezählt [51]. mCD14 ist durch einen Glykophosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran fixiert und besitzt keine transmembranäre Domäne, daher wurde schon früh erkannt, dass CD14 nicht den signalübertragenden Teil des LPS-Rezeptor darstellen kann [52].

Das Gen Toll wurde erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila* beschrieben. Dort erfüllt es eine wichtige Funktion in der Ontogenese und bei der antimikrobiellen Resistenz der Fliege [53, 54]. Das erste humane Toll-Homolog wurde 1997 entdeckt und als Toll-like Rezeptor (TLR) bezeichnet [55]. Die TLR-Familie umfasst z.Zt. 10 Rezeptoren, die alle strukturelle Übereinstimmungen aufweisen: In der extrazellulären Domäne befinden sich so genannte „leucine rich repeats“ (LRRs), die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und als so genannte Typ I-Transmembranrezeptoren die Zellmembran nur einmal durchqueren. Der zytosolische Abschnitt der TLRs ist dem *Drosophila*-Toll und dem IL-1-Rezeptor sehr ähnlich (Toll-IL-1 receptor (TIR) domain), daher weisen auch ihre intrazellulären Signalübertragungswege einen hohen Grad an Übereinstimmung auf. Der IL-1 Rezeptor und die TLRs aktivieren den NF- κ B-Signalweg; in *Drosophila* wird eine homologe Signalkaskade aktiviert [56, 57].

Die Mitglieder der TLR-Familie sind auf die Erkennung verschiedener pathogener Strukturen spezialisiert. TLR2 erkennt wahrscheinlich in Kombination mit TLR1 und TLR6 bevorzugt bestimmte Strukturen Gram-positiver Bakterien und Mykobakterien [58, 59, 60]. TLR4 erkennt vor allem LPS, wie anhand von zwei schon seit langem als LPS-hyporesponsiv bekannten Mausstämmen eindrucksvoll gezeigt werden konnte: Bei beiden Stämmen konnte ein Defekt im TLR4-Gen, in dem einen Fall eine Punktmutation, im anderen eine Deletion, als eigentliche Ursache für die LPS-Resistenz nachgewiesen werden [61, 62]. Bei Probanden, die sich unempfindlich gegenüber geringen inhalierten LPS-Dosen zeigten, wurde ebenfalls eine Mutation im TLR4-Gen gefunden [63].

Damit TLR4 effizient auf LPS reagieren kann, benötigt es das unterstützende Protein MD-2. Dabei bindet MD-2 erst an den TLR und scheint dadurch die Affinität der sich anschließend bindenden bakteriellen Bestandteile zu erhöhen [64, 65]. MD-2, das eine Signalsequenz, aber keine transmembranäre Domäne enthält, bildet in seiner sezernierten Form (sMD-2) große Oligomere, die aus stabilen dimeren Untereinheiten zusammengesetzt sind [66].

Im sich schnell entwickelnden TLR-Feld ist inzwischen auch die Funktion vieler anderer TLRs beschrieben worden: TLR3 erkennt dsRNA [67], TLR5 bakterielles Flagellin [68], TLR7 erkennt Midazoquinoline (antivirale Komponenten der Immunantwort; [69] und TLR9 bakterielle DNA [70].

1.6 Die Akutphasereaktion

Unter Akutphase versteht man die systemische Reaktion von Wirbeltieren auf eine Gewebeschädigung. Die Schäden können durch Infektionen, Traumata, Verbrennungen, Neoplasien, Ischämien und Autoimmunerkrankungen hervorgerufen werden. Die Akutphasereaktion (APR) dient dazu, optimale Bedingungen für Reparaturprozesse und -bei einer Infektion- zur Abwehr von Mikroorganismen zu schaffen [71, 72]. Die Aktivierung der APR erfolgt hauptsächlich über Zytokine: z.B. Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) und IL-1 (siehe unten).

Häufig geht die APR sowohl mit allgemeinen Symptomen wie Fieber, Krankheitsgefühl und Appetitlosigkeit als auch mit lokalen Reaktionen wie Entzündung, Nekrose und Schmerzen einher. Auf zellulärer Ebene treten beispielsweise Leukozytose mit Linksverschiebung, Aggregation von Thrombozyten, Permeabilitätserrhöhung der Membranen und Mastzelldegranulation mit Freisetzung von Mediatoren auf. Humoral führt die APR zum Anstieg der Konzentration der positiven Akutphaseproteine (APP) bzw. zum Abfall der Konzentration der selteneren negativen APPs (z.B. Albumin). APPs werden in erster Linie in der Leber synthetisiert. Positive APPs sind als Serumproteine definiert, die während der APR um mindestens 25 % ansteigen. Sie werden in zwei Klassen eingeteilt: Die Expression der Klasse I-APPs wird durch IL-6 und IL-1 stimuliert. Hierzu zählen das C-reaktive Protein (CRP), die Komplementkomponente C3 und Serum Amyloid A (SAA). Die Bildung der Klasse II-APPs wird ebenfalls durch IL-6 angeregt, IL-1 hat aber in diesem Fall keine oder eine hemmende Wirkung. Hierzu zählen beispielsweise humanes Haptoglobin und Fibrinogen [71, 72].

Die Expression von LBP wird durch IL-1 und IL-6 erhöht, wobei die beiden Interleukine synergistisch wirken. Damit ist LBP ein typischer Vertreter der Klasse I-APPs. Weiterhin verstärkt das synthetische Glukokortikoid Dexamethason (Dex) die LBP-Expression [73, 74]. Ein hemmender Einfluss auf die Synthese von LBP konnte beim Transforming Growth Factor- β 1 (TGF α -1) nachgewiesen werden (Abb. 3) [75].

Das Auftreten der pathogeninduzierten Akutphase ist eng mit dem klinischen Bild der Sepsis verknüpft, die wiederum zum septischen Schock führen kann.

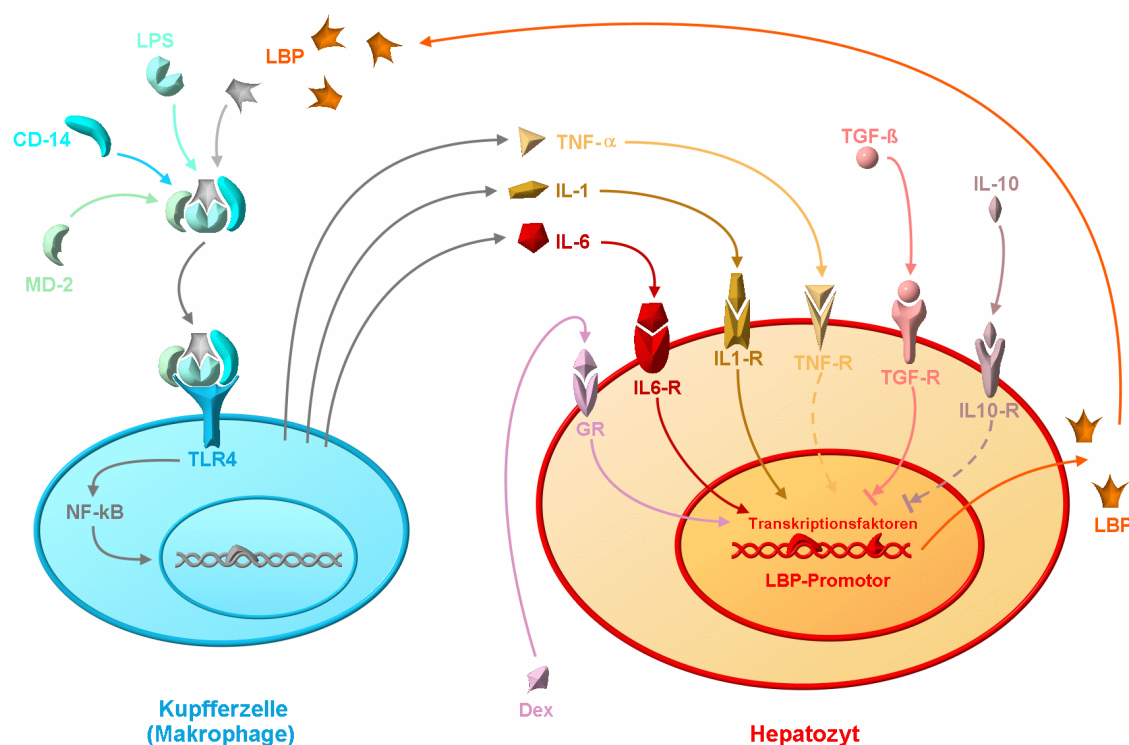


Abb. 3: LPS-aktivierte Immunantwort und LBP-Regulation

Freigesetztes LPS von Gram-negativen Bakterien wird vom LPB/CD14-Komplex erkannt und unter Beteiligung von MD-2 zum TLR-4 transportiert. Über eine komplexe Signaltransduktionskette wird unter anderem NF-κB aktiviert. Dies führt u.a. zur Biosynthese und Sekretion von IL-1, IL-6 und TNF-α aus Makrophagen. Die Zytokine stimulieren in Hepatozyten die LBP-Synthese und Freisetzung. Das synthetische Glukokortikoid Dex wirkt ebenfalls verstärkend auf die LBP-Stimulation. In einem positiven Rückkopplung verstärkt die nun erhöhte LBP-Konzentration die Reaktion auf LPS. TGF-β wirkt hemmend auf die LBP-Expression. Ein weiterer potentiell LBP-inhibierender Faktor ist IL-10. Der Bereich mit dem sich die vorliegende Arbeit befasst ist in Rottönen gefärbt.

1.7 Sepsis und septischer Schock

Die Sepsis (griech.: Fäulnis) ist eine systemische Allgemeininfektion, die infolge konstanter oder periodischer Freisetzung von pathogenen Mikroorganismen aus einem Herd erfolgt. 1991 wurde der Begriff „Systemisches Inflammatorisches Reaktions-Syndrom“ (SIRS) geprägt. Ein SIRS liegt vor, wenn mindestens zwei der folgenden Voraussetzungen gegeben sind: Temperatur höher als 38 °C oder niedriger als 36 °C, Herzfrequenz über 90 Schläge pro Minute, Atemfrequenz höher als 20-mal pro Minute, pO₂ niedriger als 32 mm Hg und Leukozytenzahl größer als 12/nl oder Nachweis von mehr als 10 % Metamyelozyten. SIRS kann nicht-infektionsbedingt verursacht werden (z.B. durch immunogene Organschädigung oder Tumorerkrankungen) oder infektionsbedingt; letzteres entspricht dann einer Sepsis [76, 77]. Die Sepsis wird zu 30 - 80 % durch Gram-negative Bakterien, zu 6 - 24 % durch Gram-positive Bakterien, zu 4 - 16 % polymikrobiell oder durch Pilze und zu 10 % durch unbekannte Erreger hervorgerufen [78], wobei

bei der Gram-negativen Sepsis die Translokation endogener Bakterien eine wichtige Rolle zu spielen scheint [79].

Eine schwere Sepsis liegt vor, wenn Organfunktionsstörungen, Hypoperfusionsstörungen oder eine Hypotonie hinzukommen. Kann die Hypotonie trotz Flüssigkeitssubstitution nicht kontrolliert werden, liegt ein septischer Schock vor. Seine Mortalität beträgt 40 - 70 % [78, 80]. Das zunehmende Auftreten der Sepsis ist unter anderem auf moderne, aufwendige medizinische Behandlungsmethoden zurück zu führen: So gelingt es zunehmend Patienten mit schlechter Allgemeinsituation durch intensivmedizinische Maßnahmen am Leben zu halten, die dann aber gegenüber Infektionen sehr anfällig sind [81]. Knochenmarkssupprimierende Behandlungsmethoden in der Onkologie sind ebenfalls mit einem hohen Sepsisrisiko verbunden. Eine Antibiotikabehandlung der Patienten führt nur begrenzt zum Erfolg: Zum einen kann die körperliche Reaktion des Infizierten so heftig und schnell verlaufen, dass die Beseitigung des Krankheitserreger zu spät greift, zum anderen kann gerade das Absterben der Mikroorganismen zur Freisetzung von Toxinen führen, die die Sepsis verstärken [82, 83].

2 Zytokine und Glukokortikoide

Die systemische APR wird neben IL-1 und IL-6 von weiteren Zytokinen reguliert: Der Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), IL-8 und Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) sind pro-inflammatorische Zytokine, IL-4, IL-10 und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) haben inhibierende Aktivität. Zytokine sind regulatorische Peptide oder Proteine, die konstitutiv nur in geringen Mengen gebildet werden, deren Synthese aber nach einem Stimulus, wie z.B. Bakterienbestandteile oder nichtinfektiöse Gewebeschäden stark ansteigt. Sie dienen der interzellulären Kommunikation und vermitteln ihr Signal über spezifische Rezeptoren. Glukokortikoide fördern nur in der Leber die Proteinbiosynthese und verstärken daher speziell die Expression von Akutphaseproteinen der Leber [84].

2.1 IL-6

Die IL-6-Familie umfasst neben IL-6 den Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), IL-11, Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) und Cardiotrophin-1. IL-6 besteht nach Abspaltung eines Signalpeptids aus 184 Aminosäuren. Nach Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung beträgt das relative Molekulargewicht 21-30 kD [85]. IL-6 wird in Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Gliazellen, Mesangiumzellen sowie in B- und T-Zellen gebildet. Es wird nur in einigen Tumorzelllinien konstitutiv exprimiert, normalerweise ist ein adäquater Stimulus erforderlich. IL-6 ist der wichtigste Mediator für die Synthese von APPs in der Leber [86, 87], hat aber auch anti-inflammatorischen Charakter. Es induziert die Ausschüttung des IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1RA) und des löslichen TNF-Rezeptors (sTNFR p55; [88]). IL-6 ist

ebenfalls ein wichtiger Differenzierungsfaktor hämatopoetischer Vorläuferzellen, aktivierter B-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Neuronen [89].

Transgene Mäuse mit IL-6-Überproduktion bilden u.a. maligne Neoplasien wie das Plasmozytom oder das Myelom aus und weisen eine Megakaryozytose auf [90]. IL-6-Knockout-Mäuse entwickeln sich normal, allerdings ist ihre Akutphaseantwort z.B. nach einer Infektion stark beeinträchtigt. Die Reaktion auf LPS ist dagegen kaum verändert [91, 92].

Der Rezeptorkomplex der IL-6-Familie besteht aus zwei Bestandteilen: Einer individuellen α -Kette (gp 80 oder „private chain“), die den Liganden bindet aber keine Signaltransduktionsfunktion aufweist. Die α -Kette bindet gemeinsam mit IL-6 ein Homodimer der β -Kette (gp 130 oder „public chain“), die den zweiten Bestandteil des Rezeptorkomplexes darstellt [93]. Dieser zweite Bestandteil vermittelt das Signal ins Zellinnere und ermöglicht über einen langen zytoplasmatischen Abschnitt die weitere Signaltransduktion. Da die β -Kette allen Mitgliedern gemeinsam ist, können die Zytokine dieser Familie redundante biologische Effekte auslösen [94]. Die beiden wichtigsten Signalwege sind zum einen der Pfad über die Tyrosinkinasen der Familie der Janus-artigen Kinasen (Jak1, Jak2, Tyk), die letztlich die Transkriptionsfaktoren „signal transducers and activators of transcription“ (Stat) aktivieren. Der zweite Weg führt über die Tyrosinphosphatase SHP₂ und die MAP-Kinasen, die ebenfalls die Stats aktivieren können, zu den Transkriptionsfaktoren der C/EBP Familie [95, 96, 97].

2.2 IL-1

IL-1 wurde erstmals in den 40er Jahren als so genanntes „endogenes Pyrogen“ beschrieben und seine induzierende Wirkung auf APPs schon 1977 nachgewiesen [98, 99]. IL-1 wird beispielsweise nach Infektion oder Verletzung hauptsächlich in Monozyten, aber auch in epithelalem, epidermalem und lymphoidem Gewebe gebildet. Sein breites Wirkungsspektrum umfasst Einflüsse auf Immunsystem, ZNS, Stoffwechsel und Gefäßsystem. IL-1 reguliert typische Symptome der Sepsis, so u.a. Fieber, Somnolenz, das „capillary leak syndrom“, Hypotonie und die Bildung von APPs in der Leber [100]. Eine hohe IL-1-Serumkonzentration indiziert eine bakterielle oder mykotische Infektion. Eine experimentelle Vorbehandlung von Pseudomonas- oder Candida-infizierten Mäusen mit IL-1 führte zu einem protektiven Effekt gegenüber der Infektion [101].

Es sind drei Mitglieder der IL-1 Familie bekannt: IL-1 α , IL-1 β und der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA), der IL-1 β inhibiert, indem er im Sinne eines kompetitiven Antagonisten den Rezeptor bindet und blockiert, aber kein Signal induziert. IL-1 β geht aus einem 31 kD großen Vorläufermolekül (pro-IL-1 β) hervor, das durch das „IL-1 converting enzyme“ (ICE oder Caspase 1) in das reife 17 kD große IL-1 β gespalten wird. ICE-defiziente Mäuse sind gegenüber der experimentellen Induktion eines septischen Schocks resistent [102, 103].

Der signaltransduzierende IL-1-Rezeptorkomplex wird aus IL-1, IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI) und dem „IL-1 receptor accessory protein“ (IL-1R-AcP) gebildet. Der IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1RII) ist ein so genannter „decoy“-Rezeptor, an den zwar IL-1 binden kann, durch den aber kein Signal

transduziert wird [104]. Die zytoplasmatische Domäne des IL-1RI weist hohe Homologie zu den TLRs auf, beide Rezeptorgruppen können unter anderem den Signalweg zum Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren [105]. Weitere Transkriptionsfaktoren die durch IL-1 induziert werden können, sind AP-1 und NF-IL6 (C/EBP β) [106, 107].

2.3 TNF- α

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wurde 1975 als Faktor beschrieben, welcher bei bakteriellen Erkrankungen zu Tumorrückbildungen führt [108]. TNF- α wird aus einem primär 26 kD großen Transmembranprotein mit Hilfe des „TNF- α converting enzyme“ (TACE) in das lösliche 17 kD große Zytokin gespalten, das in homotrimerer Form vorliegt. TNF- α wird in aktivierten Makrophagen, Lymphozyten, „natural killer cells“ (NK-Zellen), in Astrozyten und weiteren Zelltypen gebildet. Die Wirkung des TNF- α ähnelt der von IL-1, beide Zytokine wirken in der Sepsis bei systemischen Veränderungen wie Fieber und Hypotonie synergistisch. Schon wenige Minuten nach experimenteller Gabe von LPS steigt die TNF- α -Serumkonzentration im Menschen stark an. Es sind zwei TNF- α -Rezeptoren (TNFRI und II) bekannt, die beide an der Signalübermittlung beteiligt sind [109]. Bei der intrazellulären Signalübermittlung wird in einer der IL-1-Signaltransduktion ähnlichen Weise der NF- κ B-Weg aktiviert. Ebenso werden Isoformen der „mitogen activated protein kinases“ (MAP-Kinasen) aktiviert, wie p38, die „extracellular related kinases“ (ERKs) und die „c-Jun NH2-terminal kinases“ (JNKs). Ziel der TNF-aktivierten Signalübertragung können auch RNA-bindende Proteine sein, die regulierend auf die Stabilität der RNA einwirken [110, 111].

2.4 Dexamethason

Dexamethason (Dex) ist ein synthetisches Glukokortikoid, welches ca. 25-30-fach stärker wirkt als Kortisol. Die Glukokortikoide gehören zu der Gruppe der Steroidhormone und werden in der Nebennierenrinde gebildet. Sie dienen u.a. der langfristigen Stoffwechselumstellung bei vermindertem Nahrungsangebot. Dabei wird in der Leber die Glukoneogenese stimuliert, wodurch das Kohlenstoffgerüst von Aminosäuren zu Glukose umgewandelt wird. Im extrahepatischen Gewebe werden unterstützend die Glukoseaufnahme, die Glykolyse sowie die Proteinbiosynthese gehemmt. Die Hemmung der allgemeinen Syntheseleistung außerhalb der Leber führt besonders in den lymphatischen Organen zu einer reduzierten Antikörperbildung, wodurch die besonders klinisch bedeutsame entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung der Glukokortikoide zu erklären ist. Die anabole Wirkung der Glukokortikoide in der Leber bewirkt andererseits auch eine erhöhte Produktion von Zytokinen wie IL-6 und APPs. Glukokortikoide sind membrangängig und binden in den Zellen an den Glukokortikoidrezeptor (GR) [112].

Der GR gehört zur Familie der Steroidrezeptoren und besteht aus einer hormonbindenden, einer DNA-bindenden und einer transaktivierenden Domäne. Er liegt im Zytoplasma als Multiproteinkomplex mit zwei hsp90-, einem hsp70- und einem p56-Molekül vor. Die Bindung von

Glukokortikoid führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und bewirkt die Freisetzung von „chaperones“ und die Translokation des Ligand-Rezeptor-Komplexes in den Kern. Der Rezeptor selbst fungiert dabei als Transkriptionsfaktor [113].

2.5 IL-10

IL-10, 1989 erstmals beschrieben, ist ein 39 kD großes, homodimeres, nicht glykosyliertes Protein, welches 24 bis 48 Stunden nach Stimulation in Th2-Zellen, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und Keratinozyten gebildet wird [114, 115]. Der IL-10-Rezeptor ist hauptsächlich auf hämatologischen Zellen zu finden und ist dem Interferon-Rezeptor sehr ähnlich [116, 117]. IL-10 reduziert die Bildung von Klasse II-Antigenen auf Monozyten, hemmt die T-Zellfunktion, unterdrückt die Zytokinbildung in stimulierten Monozyten und deaktiviert Makrophagen [118, 119]. Die Letalität von Mäusen mit einer LPS-induzierten Sepsis konnte durch IL-10 gesenkt werden, ebenso waren die TNF- α Spiegel im Serum erniedrigt [120, 121].

2.6 TGF- β

Von TGF- β sind die drei Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 bekannt. Sie weisen eine Aminosäurehomologie von 70-79 % auf, haben aber kaum Unterschiede in ihrer Wirkung. TGF- β wird in zahlreichen Zellen wie beispielsweise in Fibroblasten, Myozyten, Chondrozyten, Astrozyten und epithelialen Zellen gebildet. Die Hauptquellen von TGF- β 1 und TGF- β 2 sind Thrombozyten, TGF- β 3 wird vor allem in mesenchymalen Zellen gebildet. Zur TGF- β -Familie gehören das „bone morphogenetic protein“ (BMP), Notal, Activin und das anti-Müllerian Hormon [122]. Alle TGF- β -Isoformen werden als große Vorläufermoleküle synthetisiert. Das reife TGF- β bildet als Dimer zusammen mit einem Dimer aus zwei Vorläufermolekülen einen vorläufigen, inaktiven Komplex [123].

TGF- β hat ein sehr breites Wirkungsfeld: Beispielsweise wirkt es immunsuppressiv, kann Zellmigration induzieren und ist an Wundheilung, Embryogenese, Onkogenese und Angiogenese beteiligt [124, 125, 126]. Frühere Studien haben gezeigt, dass TGF- β 1 in der Lage ist die Expression IL-6-induzierter APPs zu modulieren [127]. Ebenso ist TGF- β in der Lage die Expression von LPS-stimuliertem IL-6 und TNF- α zu hemmen [128]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Hepatom-Zelllinie HepG2 geeignet ist, TGF- β 1-Effekte auf APP-Expression zu untersuchen [129, 130].

Die transmembranären TGF- β -Rezeptortypen 1 und 2 bilden nach der Ligandbindung einen heterodimeren Komplex, der die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinasen bewirkt, die letztlich zur Aktivierung der so genannten Smads führt (der Name Smad ist zusammengesetzt aus den Namen der homologen Gene aus *C. elegans* (sma) und *Drosophila* (Mad, mothers against dpp)). Alternative Signalwege, die z.B. zur Aktivierung von AP-1 führen, sind ebenfalls beschrieben worden [123, 131].

3 Regulation der Genexpression

Die Regulation der Proteinexpression ist im eukaryotischen Organismus wichtigster und zentraler Mechanismus, um adäquat auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren. Grundsätzlich kann jeder der folgenden Schritte vom Gen bis zum aktiven Protein Angriffspunkt der Regulation sein: Die Transkription der DNA in RNA, das Spleißen der Vorläufer-RNA in mRNA, Transport der RNA aus dem Kern, RNA-Stabilität, Translation, Proteinaktivität und –stabilität. Vor allem der transkriptionellen Kontrolle, aber auch der Regulation der RNA-Stabilität kommt dabei in der Akutphasereaktion die größte Bedeutung zu. Dagegen haben Translation und posttranslationale Prozesse hier weniger oder keine Bedeutung [132].

3.1 Grundlagen der transkriptionellen Aktivierung

Um die Transkription eines Gens vorzubereiten, muss der entsprechende DNA-Lokus freigelegt werden. Das hoch kondensierte Chromosom liegt dann linearisiert und ohne Histone als aktives Chromatin vor. Einige Transkriptionsfaktoren, z.B. NF- κ B und SP-1, können die Histone von der DNA entfernen und dadurch die Nukleosomen auflösen. Nun erst können an die DNA die sogenannten „general transcription factors“ (oder auch basale Transkriptionskomplexe) binden und anschließend die RNA-Polymerase II sowie die Transkriptionsfaktoren. Der erste Schritt zur Bildung eines stabilen Transkriptionkomplexes besteht in der Bindung von TFIID an die TATA-Box. TFIID ist ein multimeres Protein, bestehend aus den Untereinheiten „TATA-box binding protein“ (TBP) mit einer stark konservierten, an die TATA-Box bindenden Domäne und über acht „TBP-associated factors“ (TAFs). TFIIA unterstützt bzw. stabilisiert die TFIID-Bindung. Nach TFIID bindet TFIIIB an die RNA-Polymerase II, dieser Komplex wiederum assoziiert erst mit TFIIIF und anschließend den Faktoren TFIIIE, TFIIH und TFIIJ. Faktor H hat Kinaseaktivität, wodurch die Polymerase phosphoryliert und damit aktiviert wird. Ebenso werden durch Faktor H TFIID, TFIIIE und TFIIIF phosphoryliert. Dieser basale Komplex ist notwendig, aber nicht hinreichend für die Aktivierung der Transkription. Parallel dazu binden Transkriptionsfaktoren (TF) an eine für jeden Faktor spezifische DNA-Region, die sehr weit (bis mehrere Tausend Basenpaare) vom Transkriptionsstart entfernt sein kann. Die Bindungsstellen können zahlreich oder nur vereinzelt vorhanden sein und können ebenso wie die TF aktivierende oder hemmende Eigenschaft aufweisen, d.h. durch ihr Zusammenspiel wird letztlich die Aktivität des Promotors reguliert [132, 133].

Oftmals werden Transkriptionsfaktoren als die Promotoraktivität verstärkende „enhancer“, oder als hemmende „silencer“ klassifiziert. Tatsächlich können aber einige Transkriptionsfaktoren, je nachdem in welchem Zelltyp sie auftreten, sowohl hemmende als auch aktivierende Wirkung entfalten. Teilweise ist sogar allein das Zusammenwirken mit anderen Faktoren entscheidend dafür, ob die Promotoraktivität gefördert oder inhibiert wird. Ihre Wirkung entfalten die Transkriptionsfaktoren indem sie die Stabilität des Transkriptionskomplexes oder die Transkriptionsgeschwindigkeit beeinflussen.

Typischerweise besteht ein TF aus folgenden funktionalen Elementen:

- einer regulativen Domäne, die den Zielpunkt der zellulären Signalkaskade darstellt und den TF reguliert, d.h. in der Regel aktiviert;
- einer DNA-bindenden Domäne, beispielsweise mit Zinkfinger-Struktur, bei der die AS-Kette um Zinkionen gefaltet ist und dabei fingerähnliche Strukturen ausbildet, die sich um die DNA-Helix legen;
- einer transaktivierenden Domäne, die typischerweise an den basalen Transkriptionskomplex bindet und die aktivierende oder hemmende Wirkung des Faktors vermittelt;
- Bereichen, die mit Kofaktoren interagieren.

Oftmals werden verschiedene Funktionen von nur einer Domäne vermittelt: Beispielsweise kann die Aktivierung eines TF darin bestehen die maskierte DNA-bindende Region freizulegen; es liegen also die beiden Funktionen Aktivierung des TF und DNA-Bindung auf einer Domäne.

Die hemmende Wirkung von TF wird ebenfalls über die genannten funktionalen Elemente vermittelt:

- Der TF bindet an die DNA und maskiert dabei überlappend eine benachbarte Bindungsstelle.
 - Der hemmende TF behindert die Anlagerung eines benachbarten TF an den basalen Komplex, indem er, dazwischen liegend, den direkten Zugang blockiert.
 - Der TF bindet ohne Kontakt mit der DNA direkt an einen anderen TF und blockiert ihn damit (z.B. beim Glukokortikoidrezeptor beschrieben).
 - Der TF bindet an den basalen Komplex und verhindert dadurch die Anlagerung aktivierender TF.
- Der hemmende TF kann dabei ein Abkömmling eines aktivierenden TF sein, der zwar an die DNA oder den basalen Faktor binden kann und damit den entsprechenden Ort belegt, jedoch durch eine Mutation die aktivierende Wirkung verloren hat. Dies entspricht der Funktion einer dominanten Negativmutante und ist beispielsweise bei den Smads zu finden [132, 133, 134, 135].

3.2 AP-1

„Activator protein-1“ (AP-1) gehört, wie schon an der sehr allgemeinen Namensgebung zu erkennen ist, zu den ersten beschriebenen TF. AP-1 bildet sich aus den Mitgliedern der Jun-, Fos-, und ATF2-Familie. Dazu gehören unter anderem c-Jun, Jun B, c-Fos und „Fos related antigens“ (Fras; [136]). Mit Ausnahme der Fos-Proteine können sie Homo- und Heterodimere bilden, die an die AP-1-Bindungsstelle binden. Fos bildet keine Homodimere, es ist allein nicht in der Lage an DNA zu binden. Als Heterodimer mit Jun ist die Affinität an die AP-1-Bindungsstelle aber 30-fach höher als bei einem Jun-Homodimer [137]. Während der Akutphasereaktion findet man erhöhte Konzentrationen von Jun- und Fos-Proteinen, die durch die Zytokine TNF, IL-1 und IL-6 induziert werden [138]. Da in einem Gewebe verschiedene AP-1-Kombinationen auftreten können, findet man bei EMSA-Analysen auf Grund des unterschiedlichen Molekulargewichts typischerweise mehrere AP-1-Banden. Die AP-1-Monomere gehören zur Klasse der „basic region leucine zipper“ (bZIP) DNA-bindenden Proteine. Das AP-1-System interagiert in TPA-responsiven Genen mit dem TF „E26-transformation-specific“ (ETS), der an die der AP-1-Bindungsstelle benachbarten DNA-

Bindungsstelle von PEA3 bindet und dadurch die Promotoraktivität steigert [139]. Am Kollagenase-Promotor wurde gezeigt, dass das Fos/Jun-Heterodimer direkt, ohne DNA-Bindung, an den Glukokortikoid-Rezeptor binden kann. Dadurch wird die DNA-Bindung beider Faktoren blockiert und die Glukokortikoid-induzierte Promotoraktivität gehemmt [136, 140].

3.3 C/EBP

Die TF der C/EBP-Familie können sowohl an die CCAAT-Box als auch an ein zweites Motiv mit der AS-Sequenz TGTGGAWWK (W = A oder T, K = G oder T) binden und werden daher als "(C)CAAT/enhancer binding proteins" (C/EBP) bezeichnet [141]. Das CCAAT-Box-Motiv, an welches ebenfalls TF wie CP1 und CP2 binden, ist in vielen Promotoren vertreten und vermittelt teilweise in Kombination mit ubiquitären TF die konstitutive Expression bestimmter Gene in verschiedenen Geweben. Die C/EBP-Faktoren dagegen, die hauptsächlich in der Leber exprimiert werden, werden konstitutiv nur in niedriger Konzentration exprimiert. Sie müssen durch spezifische Stimuli aktiviert werden und vermitteln daher eine spezifische Genaktivierung [142].

Die C/EBPs (C/EBP α , - β , - γ , - δ , - ϵ) weisen wie die AP-1-Proteine eine „leucine zipper“-Domäne auf. Inflammatorische Stimuli fördern die Expression von C/EBP β (synonym mit „nuclear factor IL-6“, NF-IL6) und hemmen die Expression von C/EBP α . Die transkriptionelle Aktivität von C/EBP β und C/EBP δ wird über eine IL-6-vermittelte Phosphorylierung während der Akutphase gesteigert [143]. C/EBP β (das an IL-6-responsive Elemente vom so genannten Typ I bindet) und die Mitglieder der Stat-Familie (die an IL-6-responsive Elemente vom Typ II binden) sind die wichtigsten TF, die durch IL-6 aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt über MAP-Kinasen-vermittelte Phosphorylierung der TF [144].

C/EBP β wurde als ein durch IL-1 induzierter nukleärer Faktor identifiziert, der an ein Element im IL-6-Promotor bindet und ihn aktiviert [145, 146]. Durch diese Induktion von IL-6 durch IL-1 können gewisse Wechselwirkungen bzw. Synergieeffekte zwischen den beiden Zytokinen erklärt werden. C/EBP β vermittelt ebenfalls die Aktivierung diverser APPs sowohl der Klasse I als auch der Klasse II [147, 148, 149, 150].

3.4 Stat

Zwei der sieben bekannten Mitglieder der "Signal Transducer and Activator of Transcription" (Stat)-Familie, Stat-1 und Stat-3, bilden die zweite Gruppe von TF, die durch IL-6 induziert werden kann. Die Stat-Proteine verfügen über eine bei den TF einmalige „src-homology 2“ (SH2)-Domäne. Sie vermittelt einerseits die Bindung der Stats an die Rezeptoren und andererseits, nach Tyrosinphosphorylierung durch Janus-artige Kinasen (JAK), die Dimerbildung der Stats, wobei Stat-1 und Stat-3 Heterodimere bilden und Stat-3 Homodimere. Die SH2-Domäne kann mit einer großen Anzahl von Signalproteinen interagieren, so dass die Stats mit verschiedenen Signalwegen interferieren können. An der Aktivierung der Stat sind verschiedene Zytokine beteiligt: Stat-1 wird von IL-6 und den Interferonen aktiviert, Stat-3 von allen Mitgliedern der IL-6-Familie. Nach der

Dimerbildung translozieren die Stats in den Zellkern und aktivieren die Transkription an ihren Zielorten. Der Stat-Signalweg ist sehr schnell; innerhalb von Minuten nach Zytokinstimulation sind aktivierte Stats im Kern nachweisbar [151, 152, 153].

3.5 NF- κ B

Der „nuclear factor kappa B“ (NF- κ B) besteht aus Dimeren der rel-Proteinfamilie. Typische Vertreter sind die Heterodimere p65/p52 und p65/p50. Weitere beteiligte Monomere sind c-rel und Rel B; außerdem kann NF- κ B auch als Homodimer vorliegen. Im inaktiven Zustand ist „inhibitor kappa B“ (I κ B) an NF- κ B gebunden. Durch Phosphorylierung wird I κ B abgespalten, das aktive NF- κ B transloziert in den Kern und aktiviert spezifisch die Transkription bestimmter Gene. Nur c-rel, Rel B und p65 enthalten eine Transaktivierungsdomäne und können daher transkriptionell aktivierend wirken. Homo- oder Heterodimere aus p50 und p52 haben keine direkt aktivierende Wirkung, können aber die Affinität von NF- κ B-Molekülen mit transaktivierender Domäne zur DNA erhöhen. Durch kompetitive Effekte können p50- und p52-Homodimere auch hemmende Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität haben.

NF- κ B kann durch IL-1 und TNF aktiviert werden. Bei der Stimulierung von Makrophagen durch LPS oder andere bakterielle Bestandteile über die TLRs scheint die NF- κ B-Induktion ein wesentlicher Signalweg zu sein. NF- κ B scheint somit eine zentrale Bedeutung bei immunologischen Abwehrreaktionen zu haben [111, 154, 155].

3.6 Smads

Die Smads, deren Name sich von den homologen Proteinen aus *C. elegans* (sma) und aus *Drosophila* „Mothers against dpp“ (Mad) herleitet, vermitteln die Effekte von TGF- β und BMP in der Zelle. Obwohl TGF- β auch andere TF wie beispielsweise AP-1 aktivieren kann, werden die erst in jüngerer Zeit entdeckten Smads als eigentliche TGF- β -Signalproteine angesehen. Die Smad-Familie besteht aus den rezeptorregulierten R-Smads, den inhibitorischen I-Smads und dem Ko-Smad Smad4. Smad1 und Smad 5 sind Effektoren von BMP, Smad2 und Smad3 vermitteln TGF- β -Effekte. Die aktivierte Typ I-Kinase phosphoryliert die R-Smads, worauf diese mit Smad4 einen kerngängigen Komplex bilden und zusammen mit Kofaktoren als Transkriptionsfaktor wirken [156]. Die I-Smads blockieren die TGF- β 1-Signaltransduktion, indem sie stabil an den aktivierten Rezeptor binden, die Bindungsstelle maskieren und dadurch die Bindung und Phosphorylierung der R-Smads verhindern. Der inhibitorische Effekt von TGF- β 1 wird durch die Interaktion des R-Smad/Smad4-Komplexes mit anderen Transkriptionsfaktoren, z.B. AP-1, c-Jun/c-Fos und ATF-2, vermittelt [157, 158, 159, 160]. In diesem Fall fungieren die Smads als transkriptionelle Komodulatoren, die die Aktivität der primären Transkriptionsfaktoren hemmen oder verstärken können [161, 162, 163, 164, 165].

3.7 Gfi-1

„Growth factor independence-1“ (Gfi-1) ist ein TF, über den noch nicht viele Informationen vorliegen. Das Gen des nukleären Proteins Gfi-1 wurde als eine provirale Insertion in T-Lymphoid-Zellen, die auf IL-2-Unabhängigkeit hin selektiert wurden, entdeckt [166]. Das 55 kDa große Protein ist mit seinen sechs C-terminalen Zinkfingern und seiner 20 Aminosäuren großen N-terminalen Repressor-Domäne (SNAG-Region, abgeleitet von Snail/Gfi-1) ein vermeintlicher transkriptioneller Repressor. Es bindet spezifisch an die Konsensussequenz TAAATCAC(A/T)GCA mit der kritischen Kernregion AATC. Potentielle Gfi-1-Bindungsstellen wurden in zahlreichen Promotoren gefunden, vor allem von proto-Onkogenen und Zytokinen, z.B. IL-1 α und - β , IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ und TNF- α . Dies deutet auf eine wichtige Rolle von Gfi-1 bei der Zytokinregulation hin [167].

Außerdem ist Gfi-1 an der prä-T-Zelldifferenzierung beteiligt, und das eng verwandte Gfi-1B hemmt die Myeloid-Zelldifferenzierung [168, 169]. Kürzlich wurde gezeigt, dass Gfi-1 Einfluss auf die Stat-3-vermittelte Signaltransduktion hat. Gfi-1 bindet den Stat-3-Inhibitor PIAS3 und blockiert dabei den hemmenden Effekt von PIAS3. Dadurch führt die Überexpression von Gfi-1 in HepG2-Zellen nach IL-6-Stimulation zu einer sechsfach höheren Aktivität in einem Promotor mit Stat-3-Bindungsstellen [170].

3.8 GRE und andere GR-bindende DNA-Regionen

Der Glukokortikoidrezeptor (GR), der sich inaktiv im Zytosol befindet, wird durch die Bindung der membrangängigen Glukokortikoide aktiviert, transloziert in den Kern und fungiert dort als TF. Seitdem 1985 der GR kloniert wurde, sind zahlreiche Mechanismen beschrieben worden, über die der Rezeptor die Transkription beeinflusst: Er kann direkt an funktionale DNA Elemente binden [171, 172, 173, 174, 175, 176], eine Protein-Proteinbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren eingehen [140, 177] oder beides. In beiden Fällen kann die Transkription sowohl aktiviert als auch gehemmt werden, oder es kommt zu Synergieeffekten mit anderen TF. Darüber hinaus sind posttranskriptionelle regulatorische Effekte des GR beschrieben [178].

Inhibitorische GR-Effekte werden oftmals durch die Maskierung von TF-Bindungsstellen, z.B. von AP-1 oder NF- κ B erreicht, die nahe dem „glucocorticoide responsive element“ (GRE) lokalisiert sind [179]. Der GR kann darüber hinaus direkt mit anderen TF, beispielsweise AP-1, eine Protein-Protein-Bindung eingehen, wodurch sich die beiden Faktoren gegenseitig in ihrer Aktivität blockieren [180]. Die Glukokortikoid-bindende DNA-Sequenz hat ebenfalls Einfluss auf die Wirkung des Rezeptors. „negative glucocorticoid response elements“ (nGRE), die eine inhibierende Wirkung vermitteln, weisen einen kleinen, aber deutlichen Unterschied in der Sequenz gegenüber positiven GREs (pGRE oder GRE) auf, die die Genexpression verstärken [134, 171].

3.9 Posttranskriptionelle Regulation

Die APPs werden in erster Linie transkriptionell reguliert. Bei den posttranskriptionellen Regulationsmodellen wird nur der Regulation der RNA-Transkriptstabilität eine gewisse Bedeutung

zugeschrieben. Die Menge eines in der Zelle vorliegenden spezifischen Transkripts wird einerseits von der Transkriptionsrate und andererseits von der Geschwindigkeit der mRNA-Degradation bestimmt. Daher kommt der mRNA-Stabilität grundsätzlich die gleiche regulatorische Bedeutung zu wie der mRNA-Syntheseleistung. Die als Halbwertszeit gemessene Stabilität verschiedener RNAs differiert im eukaryotischen Organismus beträchtlich: Sie beträgt zwischen etwa 15 min und 10 Stunden. Die Länge der Halbwertszeit der mRNA unterliegt spezifischen regulatorischen Prozessen: Nach dem geläufigen Modell erfolgt der Abbau der RNAs in der Regel durch eine von 5' nach 3' gerichteter Degradation, die durch Abbau der Poly-A-Sequenz und „decapping“ oder durch endonukleolytische Spaltung des Transkripts eingeleitet wird. Die Stabilität wird dabei von 5'- und 3'-„untranslated regions“ (UTR) und von stabilisierenden oder destabilisierenden Proteinen oder Nukleasen beeinflusst. Die Transkripte einiger Zytokine und Proteine, die in Entzündungsreaktionen involviert sind, z.B. IL-3, TNF- α , β -IFN, c-jun und -fos, enthalten im 3'-UTR Bereich sogenannte „activin response elements“ (AREs). Bei diesen Transkripten beginnt die Degradation mit dem Abbau der Poly-A-Sequenz, gefolgt vom „decapping“ und dem von 5' nach 3' gerichteten Verdau des Transkripts. Die Abbaurate kann durch ARE-bindende-Proteine, z.B. „embryonic lethal abnormal visual“ (ELAV), HuR oder AUF1, reduziert werden, die wiederum der Regulation durch u.a. die MAP-Kinasen p38 und JNK unterliegen [181, 182, 183, 184].

4 Zielstellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Regulation von LBP untersucht werden. LBP mit seiner LPS-erkennenden und -verstärkenden Funktion stellt sowohl bei der Infektabwehr als auch bei der Entstehung des septischen Schocks ein Schlüsselprotein dar. Die Aufklärung der LBP-Regulation kann daher z.B. dazu beitragen den septischen Verlauf in Zukunft günstig zu beeinflussen.

Bei der Untersuchung der LBP-Regulation sind folgende Themengebiete besonders Interessant:

Wie wird die aktivierende Wirkung der Zytokine IL-1 und IL-6 auf die LBP-Expression vermittelt? Wie entsteht der Synergieeffekt von IL-1 und IL-6? Welche Signalwege sind relevant und wie wird die Wirkung reguliert? Welche Transkriptionsfaktoren sind auf transkriptioneller Ebene involviert? Ebenfalls soll die Bedeutung einiger NF- κ B-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor geklärt und die Relevanz des NF- κ B-Signalwegs auf die LBP-Regulation untersucht werden.

Weiterhin soll der Einfluss des Zytokins TNF- α auf die LBP-Expression geklärt werden.

Ein weiterer Themenkomplex ist die aktivierende Wirkung des Glukokortikoids Dexamethason auf die LBP-Expression und seine synergistische Wirkung mit IL-6. Dabei ist u.a. zu klären, ob sich aktive Glukokortikoid-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor befinden und ob diese die Dexamethason-Wirkung zum Teil oder vollständig vermitteln.

Besondere Aufmerksamkeit gilt der Vermittlung des TGF- β 1-Hemmeffekts auf die LBP-Expression. Obwohl TGF- β 1 ein sehr intensiv beforschtes Zytokin ist, liegen über die Vermittlung hemmender TGF- β 1-Effekte kaum Kenntnisse vor. Es gilt zu klären wie die Signaltransduktion erfolgt und auf welcher Ebene die Regulation stattfindet und welche Faktoren und Bindungsstellen bei einer evtl. transkriptionellen Regulation beteiligt sind.

Die Wirkung des Zytokins IL-10, das evtl. einen hemmend Effekt auf die LBP-Expression ausübt soll ebenfalls untersucht werden.

Da sowohl die Initiierung als auch die Begrenzung der Akutphase ein wichtiger Prozess in der Biologie ist, werden von dieser Untersuchung wichtige Schlussfolgerungen erwartet.

II MATERIAL UND METHODEN

Puffergrundsubstanzen, Lösungsmittel und weitere Laborchemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen) und Life Technologies (Karlsruhe) bezogen.

1 Kultur eukaryotischer Zellen

1.1 Nährlösungen, Zusätze und Zelllinien

Für die Zellkultur wurden Eagle's „minimal essential medium“ (MEM) von der Firma Sigma (Taufkirchen) und RPMI (nach dem Roswell Park Memorial Institute, in dem es entwickelt wurde), Phosphatpuffer („phosphate buffered saline“ (PBS) ohne Ca^{++} und Mg^{++}) sowie Glutamax von Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Fötale Kälberserum (FCS), 2,5 % Trypsin, Na-Pyruvat und Gentamicin wurden von PAA Laboratories (Linz, Österreich) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 1 gelisteten Zelllinien verwendet.

Tab. 1: Verwendete Zelllinien

Zellen	Herkunft
Humane Hepatomzelllinie HepG2	American Type Culture Collection (ATCC) No. HB-8065, Rockville USA [185]
Humane Hepatomzelllinie HuH-7	Dr. Raynes, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, Great Britain
Humane Lungenkarzinomzelllinie A-549	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH, Braunschweig [186]

1.2 Kultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden entsprechend den Angaben ihrer Hersteller bei 37 °C unter 5 % CO_2 in MEM mit den Zusätzen 10% FCS, 1% Glutamin, 1 % Na-Pyruvat und 0,5 % Gentamicin kultiviert. FCS wurde zuvor 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert. Alle Arbeiten wurden an einer Zellkulturbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Medium wurde vor Kontakt mit der Zellkultur auf 37°C erwärmt. Ca. alle 3 Monate wurden neue Chargen der Zelllinien in Kultur genommen und nach zwei Wochen Kultur mit den Experimenten begonnen. Die Zellen wurden zweimal pro Woche umgesetzt und gegebenenfalls expandiert.

1.3 Mycoplasmen

Mycoplasmeninfektionen stellen ein großes Problem in der Zellkultur dar. Die Stimulierbarkeit und das Muster der Genexpression verändern sich bei infizierten Zellen, Wachstum und Teilungsfrequenz sind herabgesetzt. Daher wurden die Hepatomzellen bei Verdacht auf eine Infektion einem Mycoplasmentest unterzogen. Der Test wurde mit dem „Mycoplasma Detection Kit“ (Roche, Mannheim) durchgeführt, bei Kontamination wurde die Kultur über 6 Wochen mit „BM-Cyclin“ (Roche, Mannheim) behandelt, oder die Zellen wurden verworfen. Der Behandlungserfolg wurde wiederum mit dem „Mycoplasma Detection Kit“ überprüft bevor „sanierte Zellen“ wieder verwendet wurden.

1.4 Stimulation der Zelllinien

Die Zytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α , TGF- β 1 und IL-10 sind humanen Ursprungs und wurden rekombinant hergestellt. Sie wurden von R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) bezogen, Dexamethason (Dex) wurde von Sigma (Taufkirchen) erworben.

Die Zytokine und Dex wurden bei -20°C als Aliquots gelagert. Verwendete Zytokine wurden nur einmal aufgetaut, bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und innerhalb von 4 Wochen aufgebraucht. Die Zellen wurden ein bis zwei Tage vor den Experimenten in Kulturplatten ausgesät. Bei der Stimulation wurde gleichzeitig das Kulturmedium gewechselt.

2 Arbeiten mit E. coli Bakterien

2.1 Plasmide und Bakterienkultur

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Insert	Quelle
pXP2 Luci (leer) (6,2 kB)	LBP-Promotor: wt, Trunkationen, Mutationen	Schumann, Charité, Berlin
pCMV-Vektor (3,3 kB)	hLBP-Gen	Schumann, Charité, Berlin
pUC19	GAPDH-Gen	Bauer, Universität Freiburg
pUC19	β -Galaktosidase-Gen mit RSV- oder CMV-Promotor	Schumann, Berlin Charité
pUC19	wt-Gene und Mutationen von: NF-IL-6, p64, C/EBP	Leutz, Max-Delbrück-Centrum (MDC), Berlin
pLTR His (K) (4,4 kB)	Gfi-1 Gen: wt, Fragmente	Möröy, Universitätsklinikum Essen
	ELAM-1-Luciferase-Reporter Plasmid	[187]

Die Amplifikation der Plasmide und der Expressionsvektoren erfolgte in DH5-E.coli-Kulturen, die in Luria-Bertani (LB)-Medium angesetzt wurden. Alle Arbeiten wurden steril durchgeführt.

LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA)
	5 g	Hefeextrakt (Difco, Detroit, USA)
	5 g	NaCl
	ad 1 l	A. bidest., pH 7,0 mit NaOH einstellen

Zur Herstellung von Kulturplatten wurden dem LB-Medium 15 g/l Agar zugesetzt.

Nach dem Autoklavieren des LB-Mediums wurde sterilfiltriertes Ampicillin (50 μ g/ml) zugesetzt. 200 ml LB-Medium wurden mit einer E. coli Kolonie von einer LB-Agarplatte oder 100 μ l aus einem Bakterienglyzerinstock beimpft und über Nacht bei 37 °C und 170 U/min geschüttelt.

2.2 Transformation

Zur Transformation von Plasmid-DNA in E. coli wurden 50 μ l kompetente Bakterien (Life Technologies, Karlsruhe) vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit 10 ng DNA vorsichtig gemischt und für

30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 45 s einem Hitzeimpuls von 42 °C ausgesetzt, für 2 min auf Eis gestellt, 0,5 ml LB Medium zugegeben und für 1 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Schließlich wurde der Ansatz auf LB-Ampicillinplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Einzelkolonien wurden für die Bakterienkultur verwendet.

2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Bakterienkultur wurde bei 4°C und 6000 x g zentrifugiert und aus dem Bakterienpellet die Plasmid-DNA isoliert. Dazu wurde der „Maxi-Kit“ zur Präparation von Plasmid-DNA der Firma Life Technologies (Karlsruhe) verwendet.

2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA 1:100 in H₂O verdünnt und in einer Quarzküvette im UV-Spektrometer bei 260 nm gemessen, wobei eine OD von 1 33 µg/ml Einzelstrang-DNA bzw. 50 µg/ml Doppelstrang-DNA entspricht. Zur Beurteilung von Salz- und Proteinverunreinigungen wurde zusätzlich bei 280 nm gemessen: Liegt der Quotient der Messwerte 260 / 280 nm unter 1,7, ist das ein Hinweis auf eine starke Verunreinigung der DNA.

2.5 Restriktionsspaltung von DNA

Zur Kontrolle der verwendeten Plasmide und der eingefügten DNA (Insert) wurde die DNA verdaut. Dazu wurden 2-5 U Restriktionsenzym pro µg DNA, 1 x Restriktionspuffer in A. bidest. und 1 µg DNA inkubiert, wobei das Volumen des Enzyms maximal 10 % des Gesamtansatzes betrug. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde nach den Temperaturangaben des Herstellers, in der Regel bei 37 °C.

2.6 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Plasmid-DNA und Fragmente wurden regelmäßig mit Hilfe der Elektrophorese untersucht (Probegel). Dazu wurde ein Agarosegel wie folgt hergestellt und die Elektrophorese im TBE-Puffer durchgeführt.

Agarosegel	20 ml	5x TBE Puffer
	80 ml	A. bidest.
	1 g	Agarose
	2 µl	Ethidiumbromidlösung (18 µg/ml)
		Agarose aufkochen, etwas abkühlen lassen, Ethidiumbromid zugeben, Gel gießen.
5x TBE Puffer	54 g	Trisbase
	27,5 g	Borsäure
	20 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	ad 1 l	A. bidest.

6 x Ladepuffer	0.25 %	Bromphenolblau
	0.25 %	Xylencyanol
	30 %	Glyzerin in A. bidest., bei 4°C lagern

1 µg DNA wurde mit Ladepuffer und A. bidest. gemischt und bei 5 V/cm im Agarosegel aufgetrennt. Als Größenmarker diente die 100 bp- oder die 1 kb-Leiter von Life Technologies (Karlsruhe).

3 Luciferase Reportergen-Assay

Zur Bestimmung der LBP-Promotoraktivität wurden die Hepatomzelllinien mit LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukten transfiziert, und im Regelfall wurde 48 Stunden später die Luciferaseaktivität gemessen. Dabei wird Luciferin unter Lichtfreisetzung durch Luciferase oxidiert. Das gemessene emittierte Licht entspricht dabei der Luciferaseaktivität, die der Luciferasemenge äquivalent ist, welche wiederum der Promotoraktivität entspricht. Zu jedem Versuchsansatz wurde ein β-Galaktosidaseplasmid mit konstitutivem Promotor kotransfiziert und die gemessene β-Gal-Aktivität zum Abgleich der Luciferasewerte verwendet.

3.1 Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Hepatomzellen in 12-Loch-Platten mit einer Dichte von $1 - 2 \times 10^5$ Zellen/Loch ausgesät. Pro Loch wurden 4 µl Lipofectamin (Life Technologies, Karlsruhe) mit 40 µl Kulturmedium ohne Zusätze gemischt. Parallel dazu wurden 1 µg LBP/Luciferase-Plasmid-DNA und 0,2 µg β-Galaktosidaseplasmid gemischt und mit Kulturmedium auf 40 µl aufgefüllt. Bei Kotransfektionen wurden 0,2 bis 1 µg des entsprechenden Plasmids zugegeben. Die beiden Ansätze wurden gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit Kulturmedium ohne Zusätze gewaschen. Danach wurde der Ansatz mit Medium auf 400 µl aufgefüllt, vorsichtig gemischt und nach dem Absaugen der Überstände tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Die Transfektion erfolgte nun für 4 Stunden. Sie wurde durch Ersetzen des Transfektionsmediums mit FCS-haltigem Kulturmedium abgestoppt. Die Stimulierung bzw. Inkubation der Zellen mit Zytokinen und Dex erfolgte am darauffolgenden Tag, im Normalfall für 48 Stunden.

3.2 Luciferase- und β-Galaktosidasemessung

Die Luciferase- und β-Galaktosidaseaktivität wurden mit dem Luciferase Reporter Gene-Assay und dem β-Gal Reporter Gene-Assay von Roche (Mannheim) gemessen. Diese Assays enthalten auch einen Lysepuffer, der für beide Tests geeignet ist. Die Zellen wurden zuerst 2 x mit PBS

gewaschen, anschließend wurden 150 µl Lysepuffer auf die Zellen gegeben und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Danach wurden die restlichen Zellen durch Klopfen abgelöst, in 96-Loch-Platten überführt und für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Für die anschließende Luciferasemessung wurden 20 µl Überstand abgenommen und 50 µl Luciferase Reaktionspuffer dazugegeben. Die Messung erfolgte sofort nach Zugabe des Reaktionspuffers für 0,3 bis 3 sec in weißen 96-Loch-Platten (NUNC, Wiesbaden) mit dem Multifunktions-Spektrometer „SPECTRA Fluor plus“ von Tecan (Crailsheim). Bei der β -Gal-Messung wurden zu 25 µl Lysat 50 µl Substrat-Reagenz gegeben, 15-40 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, 25 µl Initiationsreagenz zupipettiert und ebenfalls sofort im Multifunktions-Spektrometer gemessen.

3.3 Auswertung

Die Messzeit betrug in der Regel 1 Sekunde, wurde aber laufend angepasst. Dabei wurde die größte Differenz zwischen den niedrigsten Probemesswerten und dem Hintergrund (leeres Loch der Platte) angestrebt, ohne dass von den hohen Probemesswerten der Messbereich des Instruments nach oben überschritten wurde. Anschließend wurde der Quotient aus Luciferase-Wert und β -Gal-Wert gebildet (β -Gal normalisiert), der in der vorliegenden Arbeit als relative Luciferaseaktivität (RLA) bezeichnet wird. Dieser Quotient bietet gegenüber den reinen Luciferasewerten („relative light units“, RLU) den Vorteil, dass Unregelmäßigkeiten in der Zellzahl und bei der Transfektionseffizienz ausgeglichen werden. Alle Versuchsansätze wurden parallel 3-fach durchgeführt und daraus der Mittelwert und die Mittelwertabweichung errechnet. Alle Experimente wurden mehrfach wiederholt und mit den beiden Hepatomzelllinien HuH-7 und HepG2 durchgeführt.

4 Mutation des LBP-Promotors

Zur Aktivitätsbestimmung potentieller TF-Bindungsstellen im LBP-Promotor wurden die Bindungsstellen durch Mutation verändert und anschließend im Luciferaseassay überprüft, ob sich die Promotoraktivität unter den spezifischen Versuchsbedingungen verändert hat. Die komplette Sequenz des LBP-Promotors und der untersuchten potentiellen TF-Bindungsstellen ist in Tabelle 3 dargestellt.

4.1 Auswahl der zu mutierenden DNA-Sequenzen

Mögliche TF-Bindungsstellen wurden in erster Linie an Hand der im Internet verfügbaren TF-Datenbank TRANSFAC 4.0 (Transcription Factor Database, <http://transfac.gbf.de/>) und der Auswertungssoftware MatInspector durchgeführt [188]. Sie gibt für jede potentielle Bindungsstelle einen Faktor an, der dem Grad der Übereinstimmung mit der Konsensussequenz entspricht. Dieser Faktor wird für die besonders wichtige Kernregion und für die weniger wichtige Randregion

angegeben („core similarity“ und „matrix similarity“). Es kann gezielt nach „starken“ Bindungsstellen gesucht werden, die eher eine direkte Wirkung auf den Promotor haben oder nach „schwächeren“ Sequenzen, die oft bei der Kooperation mit benachbarten Bindungsstellen wichtig sind. Zusätzlich wurde noch weitere Auswertungssoftware verwendet:

TFSEARCH <http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>

WWW SigScan <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/signal>

Tfsitescan <http://www.ifti.org/>

Bei neueren TF, deren Bindungsstellen noch nicht in die Datenbanken aufgenommen waren, wurde manuell gesucht und bewertet.

Die Auswahl der untersuchten Bindungsstellen erfolgte nach der Qualität der Bindungsstellen, der Lage auf dem Promotor und der Entfernung vom Transkriptionsstart sowie nach benachbarten Bindungsstellen.

4.2 Kriterien der Mutation und Übersicht

Virtuell wurden einzelne Basen ausgetauscht oder kleinere Deletionen eingefügt und danach die Qualität der Mutation, wenn möglich, im MatInspector geprüft. Dadurch wurde versucht, mit geringer Veränderung an der Wildtypsequenz des Promotors die jeweilige Bindungsstelle auszuschalten (siehe Tabelle 4). Zusätzlich wurde die Mutation so gewählt, dass eine neue Restriktionsenzym-Schnittstelle entstand, an Hand derer das erfolgreiche Einfügen der Mutation überprüft werden konnte.

4.3 Mutationsassay

Ursprünglich wurde zur Einfügung der Mutationen der Morph Site-Specific Plasmid DNA Mutagenesis Kit (Eppendorf/5 Prime Inc, Hamburg) verwendet. Für diesen Kit sind Oligonukleotide mit 30 Basen ausreichend. Nach dessen Produktionseinstellung wurde der QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet und die Mutagenese nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei muss die Schmelztemperatur der Oligonukleotide genau eingestellt werden, was zu Längen der Oligonukleotide von 45 und mehr Basenpaaren führt (siehe Tabelle 5). Die Oligonukleotide, in deren Mitte sich die Mutation befindet, dienen als Primer, und über mehrere PCR-Schritte werden Strang und Gegenstrang des mutierten Plasmids generiert. Durch einen anschließenden Verdau mit dem Restriktionsenzym Dpn I, das die methylierten Ausgangsstränge schneidet, wird das nicht mutierte Plasmid zerstört. Die mutierten Plasmide wurden anschließend in E. coli transformiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

Tab. 4: Mutierte, potentielle TF-Bindungsstellen auf dem LBP Promotor

Name ¹	TF-Bindungsstelle ²	Position ³	Orientierung	wt		Mutation	
				Sequenz ⁴	Qualität ⁵	Sequenz ⁴	Qualität ⁵
AP I	AP-1	-1638	+	TGTGACCTATT	1/0,97	TGGTACCTATT	0
AP II	AP-1	-1628	-	TGGGAGTCACC	1/0,97	TGGGAGTCGAC	0,75/0,73
AP III	AP-1	-819	+	CATGACTCCTT	1/0,92	CATGGTACCTT	0,52/0,53
AP IV	AP-1	-493	-	TCCTGGGTCACAgg	1/0,93	TCCC_____gg	
AP V	AP-1	-130	-	TAGGAGTCAGG	1/0,93	TAGGAGTCGAC	0,50/0,560
AP VI	AP-1	-68	+	TATGACTTCAG	1/0,90	GTCGACTTCAG	0,74/0,70
AP VII	AP-1	-540	+	CACACTGACTCAAT	1/0,97	CA_____AGCT	0
CEBP I	C/EBP-□	-422	+	GGTTTGAGAAACAC	0,98/0,92	GGTTTGAGATCTAC	0,6/0,6
CEBP II	C/EBP-□	-254	-	CAGTTTCCTCATCT	0,98/0,92	CAGTATACCTCATCT	0
CEBP III	C/EBP-□	-197	+	AGATGAGGCAAGAT	1/0,94	AGATGAAGCTTGAT	0
Gfi Ia	Gfi-1	-556	-	AGCAGTGATTTac	1/0,97	AGCAGTGAAGTAc	0,75/0,69
Gfi Ib	Gfi-1	-556	-	AGCAGTGATTTac	1/0,97	A_____Tcc	0
Gfi II	Gfi-1	-1167	+	aTAATCCCAGT	1/0,89	aGCATGCCAGT	0,50/0,51
Gfi III	Gfi-1	-798	-	TTCCAGATTG	1/0,84	TTCCAGCTGG	0
Gfi IV	Gfi-1	+60	+	cCAATCCACAG	1/0,83	cGCATGCACAG	0,50/0,56
GRE I	GRE	-1672	+	TCTGATCT	-	TCGGATCC	-
GRE II	GRE	-108	+	ACTGATCT	-	ACGGATCC	-
GRE III	GRE	-788	-	TTGAACATAGAAGCCT	1/0,6	TTGAATTTCAGAAGCCT	0
GRE IV	GRE	-417	+	GAGAAACACTGTTTTTC	1/0,68	GAGAAACAGAAATTTTC	0,52/0,52
GRE V	GRE	-185	-	ATGAACAGTGATGAAT	1/0,54	ATGCCGAGTGATGAAT	0
NFkB I	NF-□B	-1701	+	TGGGGTTCCC	-	CCGGGTTGGC	-
NFkB II	NF-□B	-515	-	GGGCAAGTCCct	-	G_____tt	-
Smad I	Smad	-303	-	GTCTG	-	GCGGG	-
Smad II	Smad	-1294	-	GTCTG	-	GCTGG	-
Stat I	Stat-3	-447	-	TTCCAGAAAAT	1/0,91	ATGGAGAAAAT	0,6/0,6
Stat II	Stat-3	-399	+	TTGGGGGAA	1/0,89	TTGGGGTTA	0,73/0,61

¹ Name der Mutation² Name der potentiellen TF-Bindungsstelle³ Position der ersten Base der potentiellen Bindungsstelle am 5'-Ende⁴ Sequenz der Bindungsstelle in Großbuchstaben, angrenzender Bereich klein⁵ Qualität der Sequenz nach MatInspector [188]

Tab. 5: Verwendete Oligonukleotide zur Mutation des LBP-Promotors

Name*	Sequenz	Position
AP I	GCCTGCCAGTGCTGTTTGGTACCTATTGGGAGTCACCC	-1654 bis -1617
AP II	CCTATTGGGAGTCGACCTGTTAATCCCACCACATTCAAGTTGG	-1633 bis -1592
AP III	CCCCACAACCAGAGACAATGCCTCATGGTACCTTGCTAAATATTTTCC	-843 bis -795
AP IV	GGCAAGTCCCTGAAATTGAATTCCCGGGCATGCAACTGTTTAAACATTTGCC	-514 bis -455
AP V	GGGATGATCATAGGAGTCGACCTTCCTCATCCACTGATCTAGGC	-140 bis -97
AP VI	GGCTTCTAAGTATGACCTGTGCACTTCAGTGATGATCGCAAGCAGGTTCC	-86 bis -37
AP VII	GTGATTTACTGGCAAGCTTATGTATTTAAG	-552 bis -515
CEBP I	CACCACCAGCAAGGTTTGAGATCTACTGTTTTCCATTGGGGG	-434 bis -393
CEBP II	GTGGCTTTTTTGAACCTCAGTATACTCATCTGCTAAACCAGGCC	-271 bis -228
CEBP III	GAGACTGGCTGAGATGAAGCTTGATGAACAGTGATGAATATGGG	-208 bis -165
Gfi Ia	TATCTTGAGCAGTGAAGTACTGGCACACT	-564 bis -535
Gfi Ib	CAGTGGTATCTTGGATCCTGGCACACTGAC	-570 bis -532
Gfi II	GGGCATGGTGGCCCAAGTCTAGCATGCCAGTATTTTGAAGGCC	-1188 bis -1145
Gfi III	CCTTGCTAAATATTTTCCAGCTGGTTGAACATAGAAGCCTATTTTGAACCCCC	-812 bis -759
Gfi IV	CTTAAGGGACCTGGGCCGCATGCACAGCTGGGACAGTCC	+43 bis +81
GRE I	TGGGACATTCCGATCCTAACCTCA	-1680 bis -1657
GRE II	CCTCATCCACGGATCCAGGCAGTG	-116 bis -93
GRE III	CCAGATTGTTGAATTCAGAAGCCTATTTTGAACCCCCCAAATAGAAC	-796 bis -748
GRE IV	CACCACCAGCAAGGTTTGAGAAACAGAATTTTCCATTGGGGG	-434 bis -393
GRE V	GGCTGAGATGAGGCAAGATGCGCAGTGATGAATATGGGG	-202 bis -164
NFkB I	GGCCTGGACTGCCGGGTTGGCTGTGCTTAACGTGGG	-1712 bis -1677
NFkB II	CAATTATGTATTTAAGCTTGAAATTGAATTC	-530 bis -492
Smad I	CACTCTCAACCCTGCCGCGGGCTGGGGGTGAG	-319 bis -288
Smad II	GCAGGGCTGGGGCAAACTCTAAAAATTAAACACAGCTGGTACTATAAATTTTG	-1329 bis -1276
Stat I	CATTTGCCAATTGCCATGGAGAAAATTTACCACCAGCAAGGTTTG	-462 bis -417
Stat II	GAGAAACACTGTTTTCCATTGGGGTTAACATTTATTTTAAATAAACGAGCC	-417 bis -365

*Name der Mutation, für die die Oligonukleotide verwendet wurden

4.4 Probeverdaue mit Restriktionsenzymen

Kolonien aus dem Mutationsansatz wurden einzeln ausgewählt („gepickt“), kultiviert und die Plasmid-DNA isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden). Jede eingefügte Mutation wurde so ausgelegt, dass gleichzeitig eine neue Restriktionsenzym-Schnittstelle eingefügt wurde. Daher wurde anschließend ein Doppelverdaue angesetzt: Zum einen mit dem Enzym für die neu generierte Schnittstelle und zum anderen in der Regel mit BamH I oder Xho I. An diesen Schnittstellen ist der LBP-Promotor in den Luciferase-Vektor integriert. Über ein Probegel wurde die Mutation durch das jeweils spezifische Fragment nachgewiesen. Zusätzlich wurde der mutierte Bereich kontrollsequenziert und bei kritischen oder unerwarteten Ergebnissen eine zweite Mutation zur Kontrolle durchgeführt.

5 EMSA

Beim „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) werden DNA-Protein-Interaktionen untersucht: Die Bindung eines Proteins (in der Regel eines TF) an die DNA (ein Oligonukleotid mit der Sequenz eines bestimmten Promotorabschnitts) führt gegenüber der freien DNA zu einer Veränderung der Laufeigenschaften in der Elektrophorese, d.h. zu einem „Shift“. Dieser ist an einer Verschiebung der radioaktiv markierten DNA-Bande zu erkennen. Wird zusätzlich noch ein spezifischer Antikörper gegen das DNA-bindende Protein zugegeben, tritt eine weitere Verschiebung der Bande auf, ein sogenannter „Supershift“.

5.1 Zellkultur und Stimulation

Es wurden etwa 1×10^6 Hepatomzellen in eine 10 cm Kulturschale ausgesät und am nächsten Tag für 15 min bis 48 Stunden stimuliert. Bei kurzen Stimulationszeiten wurde die Zelldichte entsprechend höher gewählt. Typischerweise betrug die Konfluenz der Zellen bei Lyse 80 %.

5.2 Isolierung nukleärer Proteine

Nach Beendigung der Stimulierung wurden die Zellen mit 10 ml eiskaltem (1x) PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit einem Schaber vom Untergrund abgelöst und bei 1000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 400 µl Puffer A resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert.

Puffer A	10 mM	HEPES, pH 7,6
	10 mM	KCl
	0,1 mM	EDTA
	0,1 mM	EGTA
	1 mM	DTT
	0,1 mM	Na ₃ O ₄ Va
	0,5 mM	PMSF
	1 mM	Leupeptin (Na ₃ O ₄ Va, PMSF, Leupeptin und DTT werden erst kurz vor Gebrauch zugegeben)

Anschließend wurden 25 µl 10 % Nonidet NP40 zugegeben, geschüttelt und bei 4 °C bei 13000 g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt die zytoplasmatischen Proteine. Die Pellets wurden in 50 µl Puffer B resuspendiert.

Puffer B	400 mM	KCl
	20 mM	HEPES, pH 7,6
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	1 mM	DTT
	0,1 mM	Na ₃ O ₄ Va
	0,5 mM	PMSF
	1 mM	Leupeptin (Na ₃ O ₄ Va, PMSF, Leupeptin und DTT werden erst kurz vor Gebrauch zugegeben)

Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 30 min im Überkopfschüttler geschüttelt und 5 min bei 4 °C und 13000 g zentrifugiert. Die Überstände enthielten die nukleären Proteine. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bio-Rad Protein-Assay, Bio-Rad, München) bei 595 nm im Photometer gemessen. Anschließend wurden die Proben aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

5.3 Hybridisierung und Markierung der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Genset Oligos (Paris, Frankreich) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert. Für den EMSA wurden i.d.R. 30 bp lange Oligonukleotide verwendet, die so gewählt wurden, dass sich die TF-Bindungsstelle im Zentrum befand.

Jeweils 10 µg der komplementären Einzelstrang-DNA wurden mit 4 µl 10 x T4-PNK-Puffer gemischt und mit A. bidest. auf 40 µl aufgefüllt, für 2 min auf 95 °C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Markieren der doppelsträngigen Oligonukleotide erfolgte durch Phosphorylierung mit dem Phosphorisotop ^{32}P . Die PNK (Polynukleotid Kinase) wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen und das $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ von NEN/PerkinElmer (Zaventem, Belgien).

Reaktionsansatz	1 µl	dsDNA (= 0,5 µg DNA aus dem Standardansatz)
	7 µl	10 x PNK-Puffer
	2 µl	T4-PNK Kinase (1:10 verdünnt mit Kinase-Deletionspuffer)
	4 µl	$\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$
	56 µl	A. bidest.

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Über Nick-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden die freien Radionukleotide von der markierten doppelsträngigen DNA chromatographisch abgetrennt.

5.4 DNA-Protein-Inkubation, Gellauf und Visualisierung

Es wurden 4 µg nukleäre Proteine, 2 µl BSA (1 µg/µl), 2 µl Puffer D⁺ und 4 µl Puffer F gemischt und mit A. bidest. auf 19 µl aufgefüllt. Zuletzt wurde 1 µl markiertes Oligonukleotid zugegeben, gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Puffer D+	20 µl	HEPES, pH 7,9
	4 %	Glyzerin
	100 mM	KCl
	0,5 µM	EDTA
	0,00063 %	NP-40
	2 mM	DTT
	0,1 %	PMSF
	ad 1000 µl	A. bidest.

Puffer F (pH 7,2)	400 mM	Ficoll
	100 mM	HEPES
	100 mM	KCl
	10 mM	DTT
	1 mM	PMSF

Für die Gfi-1-Shifts wurde folgender Puffer verwendet:

Gfi-1-Puffer-Mix	4 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	80 mM	NaCl
	0,5 mM	ZnSO ₄
	1 mM	EDTA
	0,5 mM	DTT
	5 %	Glyzerin

Die Ansätze wurden in einem 4 %-igen PAA-Gel mit 0,5 x TBE Laufpuffer 1 Stunde bei 200 V aufgetrennt.

PAA-Gel (4 %)	5 ml	5 x TBE Puffer
	5 ml	40 % PAA
	250 µl	10 % APS
	25 µl	Temed
	40 ml	A. bidest.

Nach dem Gellauf wurde das Gel für eine Stunde auf Filterpapier in einem beheizbaren Trockner mit Vakuumpumpe getrocknet. Anschließend wurde das Gel für 30 min bis mehrere Tage auf speziellem Filmmaterial exponiert (Kodak, bezogen über Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

6 LBP-ELISA

Die LBP-Konzentration in den Kulturüberständen der Hepatomzellen wurde mit dem „sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay“ (Sandwich-ELISA) gemessen. Dabei immobilisiert ein anti-LBP-Antikörper (Ak), der auf einer speziellen ELISA-Platte fixiert wurde, LBP. Mit einem zweiten, biotinylierten anti-LBP-Ak wird das LBP mittels einer Farbreaktion nachgewiesen.

6.1 Zellkultur und Zellstimulation

Für den LBP-ELISA wurden die Hepatomzelllinien in 24-Loch-Platten mit $0,5 \times 10^5$ Zellen/Loch ausgesät. Am nächsten Tag folgte die Stimulierung mit Zytokinen und Dex in 200 µl Medium/Loch für 24 bis 48 Stunden.

6.2 Durchführung des ELISA

Coating-Puffer	100 mM	NaHCO ₃ , pH 8,2
Verdünnungspuffer	1 x	PBS
	10 %	FCS
Waschpuffer	1 x	PBS
	0,05 %	Tween 20

Die ELISA-Platte (MaxiSorp Immunoplatte, 96-well, NUNC, Wiesbaden) wurde mit 50 µl/well Coating Puffer und 0,1 µg/well des 1. Ak (polyclonal Rabbit anti-hLBP Ak, XOMA, Berkeley, USA) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Platte mit 200 µl/well Verdünnungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden eine LBP-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration (rLBP-Standard, Xoma) und 100 µl/well Zellkulturüberstände auf die Platte gegeben und nach einer Stunde 4 x gewaschen. Dann wurden 100 µl/well Verdünnungspuffer und 30 pg/well des 2. Ak (biotinylierter 1. Ak) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und 4 x gewaschen. Streptavidin-Peroxidase (Sigma, Taufkirchen) wurde mit Verdünnungspuffer 1:1000 verdünnt und die Platte mit 100 µl/well für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 4 x gewaschen. Durch Zugabe von 100 µg/well OPD-Substrat (o-Phenylenediamine Dihydrochloride, Tablet Sets, Sigma) erfolgte die Farbreaktion, die nach Augenmaß (5 – 30 min) durch Zugabe von 50 µl/well 2 M Schwefelsäure abgestoppt wurde. Die Extinktion der Proben wurde mit einem Spektrometer (SpectraFluor Plus, Tecan, Crailsheim) bei 492 nm gemessen und die LBP-Konzentration anhand der Eichkurve ermittelt.

7 Northern-Blot Analyse und RT-PCR

Beim Northern-Blot wird die RNA (Gesamt-RNA oder mRNA) isoliert und auf einem Gel nach Fragmentgröße aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen („geblottet“). Mit Hilfe einer ³²P-markierten Sonde (einem DNA-Strang-Abschnitt aus dem zu detektierenden Gen, der mit der entsprechenden RNA hybridisiert) kann die RNA-Akkumulation nachgewiesen werden. Dazu wird die Membran mit der Sonde inkubiert, dann gewaschen und die Radioaktivität durch Auflegen eines Films nachgewiesen.

7.1 Zellkultur und Zellstimulierung

HuH-7 oder HepG2 Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Platte in Schalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät. Nach 2 bis 3 Tagen, bei einer Konfluenz von ca. 80 %, wurden die Zellen für 24 bis 72 Stunden stimuliert.

7.2 Isolierung der RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wird durch Zugabe von RNase-Inhibitoren gewährleistet, dass die RNA nicht durch zelleigene RNAsen zerstört wird. Durch β -Mercaptoethanol, das eine stark denaturierende Wirkung auf Proteine ausübt, werden die RNA-Protein-Komplexe aufgelöst. Die Abtrennung der RNA erfolgt über Säulen, an deren Matrix sich die RNA bindet und von der sie nach mehreren Waschschritten unter geeigneten Bedingungen wieder abgelöst wird.

7.3 Gelelektrophorese der RNA

Die Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit Agarose-Formaldehydgel in MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure).

Für 200 ml eines 1,2 %-igen denaturierenden Agarosegels wurden 170 ml A. bidest. mit 2,4 g Agarose aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf etwa 40 - 50 °C wurden 20 ml 10x MOPS und 6 ml 37 % Formaldehyd zugegeben.

10x MOPS	0,2 M	MOPS, pH 7,0 in A. bidest.
	80 mM	Natriumazetat
	5 mM	EDTA
Laufpuffer	1x	MOPS
RNA-Ladepuffer	1 mM	EDTA, pH 8,0
	0,25 %	Xylencyanol
	0,25 %	Bromphenolblau
	50 %	Glyzerin
RNA-Probepuffer	300 μ l	10x MOPS-Puffer
	520 μ l	37 % Formaldehyd, pH>4,0
	150 μ l	Formamid
	360 μ l	A. bidest.

15 μ g Gesamt-RNA wurden, wenn nötig, in einer Vakuumzentrifuge auf 2 μ l eingengt und mit 13 μ l Probenpuffer aufgefüllt, 15 min bei 5 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 2 μ l Ladepuffer auf dem Gel bei 3 V/cm aufgetrennt.

7.4 Übertragen der RNA auf eine Nylonmembran („blotten“)

Nach dem Gellauf wurde die RNA mit einer Vakuum Blotting-Apparatur (Amersham) auf die Hybond N+ Nylonmembran (Amersham) übertragen. Zuerst wurde das Gel 2 x 5 min in A. bidest. und 30 min in 10 x SSC-Puffer (1,5 M NaCl, 0,15 M Natriumzitat x 2 H₂O, pH 7,0) gewaschen. In 20 x SSC-Puffer wurde anschließend die RNA in der Blotting-Apparatur auf die Membran

übertragen (4 Stunden). Auf der dann getrockneten Membran wurde durch eine UV-Strahlenquelle (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, USA) die RNA an der Membran fixiert.

7.5 Herstellung der cDNA-Sonde

Die Sonde stellt den Abschnitt eines Gens dar, dessen mRNA nachgewiesen werden soll. Dazu wurde ein Plasmid, welches das Gen trägt, in *E. coli* vermehrt und, wie im Abschnitt „DNA-Präparation“ beschrieben, isoliert. Das Plasmid wurde unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme verdaut und das Fragment in einem 1 %-igen Agarosegel separiert. Die Isolierung des Fragments aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden).

7.6 Radioaktive Markierung der Sonde

Die Markierung der Sonde erfolgte mit dem Megaprime DNA Labelling System von Amersham Pharmacia (Freiburg) nach Herstellerangaben. In Kürze: Die denaturierten DNA-Einzelstränge der Sonde wurden mit kurzen Zufallsprimern, einem Mix aus Nukleosidtriphosphaten (außer CTP), dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase aus *E. coli* und dem Reaktionspuffer gemischt. Dazu wurde radioaktives α -³²P-dCTP gegeben, das bei der Synthese des DNA-Gegenstrangs integriert wurde. Die überschüssigen Nukleotide wurden über NAP-10 Säulen (Amersham) nach Herstellerangaben abgetrennt.

7.7 Hybridisierung von RNA und Sonde

Zuerst wurde bei der Prähybridisierung die Membranoberfläche der Nylonmembran, die eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren aufweist, so abgesättigt, dass die (DNA-) Sonde nicht unspezifisch an die Membran binden konnte. Dazu wurde der Blot für 3 Stunden bei 68 °C in Prähybridisierungslösung inkubiert.

50x Denhardts Lösung	5 g	Ficoll
	5 g	Polyvinylpyrrolidon
	5 g	BSA
	ad 500 ml	A. bidest. (bei -20 °C lagern)
Prähybridisierungslösung	5 x	Denhardts Lösung
	6 x	SSC-Puffer
	0,5 %	SDS
Hybridisierungslösung	6 x	SSC
	0,5 %	SDS
	100 mg/ml	Kalbsthymus-DNA
	50 %	Formamid (deionisiert)

Zur Hybridisierung wurde in die Hybridisierungslösung die bei 95 °C für 5 min denaturierte Sonde gegeben ($1 - 2 \times 10^6$ cpm/ml) und die Membran für 12 – 16 Stunden bei 42 °C in einem speziellen Hybridisierungssofen inkubiert. Dabei befand sich der Blot in einer zylinderförmigen Glasflasche, die sich in permanenter Drehbewegung befindet und dadurch bei minimaler Menge der Hybridisierungslösung (und der radioaktiv markierten Sonde) eine gleichmäßige Benetzung des Blots gewährleistet.

Anschließend wurde die Membran wie folgt gewaschen:

Schritt	Waschpuffer	Temperatur	Zeit
1	2x SSC, 0,5% SDS	25 °C	5 min
2	2x SSC, 0,1% SDS	25 °C	15 min
3	0,1x SSC, 0,5% SDS	37 °C	30 min
4	0,1x SSC, 0,5% SDS	68 °C	10 min
5	0,1x SSC	25 °C	5 min

Die Schritte 3 und 4 wurden bei unspezifischen Signalen und hohem Hindergrund wiederholt. Danach wurde die noch feuchte Membran in Folie eingeschlagen und ein Röntgenfilm belichtet (Kodak X-OMAT-AR über Amersham, Freiburg).

7.8 Mehrfachhybridisierung

Eine Nylonmembran kann mehrfach mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden. Dies wurde regelmäßig mit einer GAPDH-Sonde als „house keeping“-Kontrolle durchgeführt: GAPDH wird konstitutiv exprimiert und dient der internen Kontrolle und dem Abgleich von RNA-Menge und -Qualität. Dazu wurde der Blot „gestrippt“, d.h. bei 85 °C für 15 min in A. bidest. gewaschen und dadurch die alte Sonde entfernt. Anschließend wurde der Blot wie beschrieben prähybridisiert und erneut hybridisiert.

7.9 Reverse Transkription (RT)-PCR

Für die RT-PCR wurde die Gesamt-RNA wie unter 7.2 beschrieben mit dem RNeasy Kit von Qiagen isoliert. Die reverse Transkription und die PCR wurden getrennt durchgeführt. Die RT-Reaktion wurde unter Verwendung des Omniscript Reverse Transcriptase-Kit von Qiagen nach Firmenangaben mit 3 µl der Gesamt-RNA durchgeführt.

Master-Mix	10,9 µl	A. bidest.
	2,5 µl	10x Puffer
	2 µl	dNTPs
	0,5 µl	MgCl
	2,5 µl	Primer sense (5µM)
	2,5 µl	Primer antisense (5 µM)
	0,125 µl	Taq-Polymerase

Für die PCR wurden zu 21 µl „Master-Mix“, der unter Verwendung des Taq PCR Core Kit von Qiagen hergestellt wurde, 4 µl cDNA aus der RT-Reaktion gegeben. Folgende Primer wurden verwendet:

Gfi-1sense 5'-TACAAGTGCATCAAGTGCAGC-3'

Gfi-1antisense 5'-TTGTGAAGCTTCTCACCAGTG-3'

Die Gfi-1-PCR wurde mit 30 Zyklen durchgeführt, und zwar erst für 30 s bei 95° C, dann 45 s bei 60° C und schließlich 30 s bei 72° C. Danach wurden die Proben für 10 min bei 72° C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5 µl der PCR-Proben wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben in einem 1,5 %igem Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert.

8 Western-Blot-Analyse und p44/42-Kinase-Assay

Beim Western-Blot werden isolierte Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Membran fixiert. Über anschließende Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern können bestimmte Proteine nachgewiesen werden.

8.1 Zellkultur und Zellstimulierung

HuH-7- oder HepG2-Zellen wurden mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen/Loch in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 2 bis 3 Tagen, bei einer Konfluenz von ca. 80 %, wurden die Zellen in der Regel für 20 min mit Zytokinen stimuliert.

8.2 Isolierung der zytoplasmatischen Proteine

Lysepuffer	20 mM	Tris Acetat
	0,1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	1 mM	Na ₃ O ₄ Va
	10 mM	Na ₂ -2-Glycerophosphat
	50 mM	NaF
	5 mM	Pyrophosphat
	1 %	Triton X100
	1 mM	Benzamidin
	0,27 M	Sucrose, auf pH 7,5 einstellen
	1 mM	PMSF und
	1 µg/ml	Leupeptin vor Gebrauch zugeben

Die stimulierten Zellen wurden in kaltem PBS mit 1 mM Na₂O₄Va zweimal gewaschen und mit 150 µl/well kaltem Lysepuffer für ca. 10 min bei 4° C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Schaber abgelöst und 20 min bei 13000 U/min und 4° C zentrifugiert. Im Überstand befand sich die postmitochondriale Fraktion mit den zytoplasmatischen Proteinen. Die

Proteinkonzentration wurde gemessen, die Überstände aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

8.3 Gel und Gellauf

SDS-Trenngel (10 %, 15 ml)	SDS- Sammelgel (5 %, 5 ml)	
7,15 ml	3,6 ml	H ₂ O
10 %	5 %	Acrylamid
0,38 M	-	Tris (pH 8,8)
-	0,125 M	Tris (pH 6,8)
0,1 %	0,1 %	SDS
0,1 %	0,1 %	APS
6 μl	5 μl	TEMED

Das Trenngel wurde bis 1 cm unterhalb des Kammendes gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Wasser abgekippt und das Sammelgel darüber gegossen.

Pro Ansatz wurden 30 μg Protein verwendet und die entsprechende Menge 4 x Probenpuffer hinzugegeben (Endkonzentration 1 x).

Probenpuffer	200 mM	Tris-HCl pH 6,8
	400 mM	DTT
	8 %	SDS
	0,4 %	Bromphenolblau
	40 %	Glyzerin

Die Proben wurden anschließend 5 min bei 95°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Das Gel wurde beladen und bei 80 V gestartet. Nachdem die Proben vollständig in das Trenngel eingelaufen waren, wurde die Spannung auf 150 V erhöht.

Laufpuffer	25 mM	Tris-Base
	250 mM	Glyzerin
	0,1 %	SDS, pH 8,3

8.4 „Blotten“ und Detektion

Transferpuffer	25 mM	Tris-Base
	200 mM	Glyzerin
	20 %	Methanol, pH 8,5

Die Membran (Milipore Immobilon-P, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde kurz in EtOH (100%, unvergällt) gespült und anschließend 10 min in Transferpuffer inkubiert. Das Gel wurde ebenfalls 10 min in Transferpuffer inkubiert. Das Blotten erfolgte in einem Semitrocken-Verfahren mit der Blottingapparatur von Hölzer GmbH (Dörfen). Dazu wurden der Reihenfolge nach zwei Lagen dickes, mit Transferpuffer getränktes Whatman-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel), die

Membran, das Gel und nochmals getränktes Whatman-Papier auf die Apparatur gelegt und bei 15 mA für 1,5 Stunden geblottet.

Die Membran wurde anschließend kurz in PBST (PBS mit 0,05 % Tween 20) gespült und die Membran für 1 Stunde in 20 ml Blockierlösung (PBST mit 5 % Milchpulver) bei RT inkubiert, danach 3 x 5 min in PBST gewaschen und mit dem primären Antikörper in 15 ml PBST über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 6).

Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5 min in PBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper in 15 ml PBST für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dann 2 x 5 min in PBST gewaschen und weitere 2 x 5 min in PBS gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL-System (Western blotting detection reagents) und Hyperfilm ECL Film von Amersham nach Angaben des Herstellers.

8.5 Strippen, neue Antikörperbindung

Striplösung	62,5 mM	Tris-HCl
	100 mM	Mercaptoethanol
	2 %	SDS

Sollte auf der Membran ein zweites Protein nachgewiesen werden, wurde sie für 15 min bei 50 °C in Striplösung inkubiert, 3 x 5 min in PBST gewaschen, 30 min in Blockingpuffer blockiert und 3 x 5 min in PBST gewaschen. Die Detektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Tab. 6: Verwendete Antikörper

Name	Firma	Puffer	Verdünnung
Phospho-p44/42 MAP Kinase	Biolabs	PBST+5 %BSA	1:2000
p44/42 MAP Kinase	Biolabs	PBST+5 %BSA	1:2000
Phospho-p38	Biolabs	PBST+5% BSA	1:1000
Jak2	Santa Cruz	PBST+1% BSA+1% Milchpulver	1:200
Phospho-Stat-1	Biolabs	PBST+5% BSA	1:1000
Phospho-Stat-3	Biolabs	PBST+5% BSA	1:1000
JNK1	Santa Cruz	PBST+1% BSA+1%Milchpulver	1:200

8.6 p44/42-Kinase-Assay

Die p44/42-Kinaseaktivität wurde mit einem Messsystem von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) nach modifizierten Herstellerangaben nachgewiesen. Die p44/42-Kinase katalysiert den γ -Phosphat-Transfer von Adenosin-5'-Triphosphat zu einem spezifischen Peptid. Durch die Bindung des Peptids an ein spezielles Filterpapier kann das nicht umgesetzte Phosphat abgetrennt werden. Detektiert wird die Radioaktivität des verwendeten Isotops ^{33}P .

Pro Ansatz wurden 5 μg Protein mit Lysepuffer (Proteinisolierung und Lysepuffer siehe Western-Blot) auf 15 μl aufgefüllt, 10 μl Substrat, 5 μl kaltes ATP und 1 μCi (γ - ^{33}P)ATP (Amersham)

gemischt, bei 37 °C inkubiert und nach 30 min mit 10 µl Stopplösung abgestoppt. 30 µl des Ansatzes wurden auf das spezielle Filterpapier aufgebracht, erst 2 x 2 min in 1 %-iger Essigsäure, dann 2 x 2 min in A. bidest. gewaschen und im Szintillationszähler (Liquid Scintillation Counter, Raytest, Berlin) die Aktivität gemessen.

9 FACS-Messungen

Mit Hilfe von Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)-Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit die Integration von Rezeptoren auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Dabei bindet ein erster Ak spezifisch an den Rezeptor, an den ein zweiter, Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)-markierter Ak bindet. Die Fluoreszenz jeder Zelle wird im FACS-Gerät gesondert gemessen, aufgrund der großen Anzahl erfasster Zellen sind statistisch gesicherte Aussagen leicht möglich.

9.1 Zellkultur und -stimulierung

Die Hepatomzellen wurden in einer Dichte von $0,5-1 \times 10^5$ Zellen/Loch in einer 24-Loch-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit Zytokinen und Dex stimuliert.

9.2 Antikörperinkubation und Fixierung

1. Antikörper: Anti-human IL-6 R Antibody, Goat (R&D Systems, Wiesbaden) oder Anti-human gp130 Antibody, Goat (R&D Systems, Wiesbaden)
2. Antikörper: FITC-conjugated Anti-Goat IgG, Rabbit (Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, USA)

Nach Abschluss der Stimulierung wurden die Zellen 2 x mit 0,5 ml FACS-Puffer (1 x PBS mit 5 % FCS) gewaschen und für 1 Stunde bei 37 °C mit dem 1. Ak inkubiert (0,5 µg/Loch in 200 µl FACS-Puffer). Anschließend wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen ebenfalls für 1 Stunde mit dem zweiten, FITC-markierten AK inkubiert (1:25 in 200 µl FACS-Puffer). Dieser und folgende Schritte wurden aufgrund der Lichtempfindlichkeit von FITC lichtgeschützt durchgeführt. Nach der Ak-Inkubation wurden die Zellen nochmals zweimal gewaschen und in 0,5 ml/Loch Fixierpuffer (PBS, 0,5 % Formaldehyd) abgelöst und maximal 7 Tage bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

9.3 Messung und Auswertung

Die FACS-Messungen wurden mit einem FACS-Scan (Becton Dickinson, Heidelberg) und der zugehörigen Software (CellQuest, Becton Dickinson) durchgeführt. Da nur mit Hepatomzelllinien gearbeitet wurde, war keine Abgrenzung zu anderen Zellpopulationen nötig. Pro Ansatz wurde die Fluoreszenz von 50 000 Zellen gemessen und der Mittelwert berechnet. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

10 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Alle dargestellten Ergebnisse zeigen Versuche, die mindestens dreimal erfolgreich durchgeführt wurden. Die Ergebnisse wurden, wenn nicht anders bemerkt, in den beiden Zelllinien HepG2 und HuH-7 durchgeführt und bestätigt. Wurden A-549 Zellen verwendet, ist ausdrücklich darauf hingewiesen.

Die Abbildungen aus EMSA und Western- und Northern-Blot wurden in dem Programm Adobe Photoshop D1-4.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) bearbeitet. Die Berechnung der Mittelwerte, der Mittelwertabweichungen und der Signifikanzen, sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden mit den Programmen Excel 97, Power Point 97 (Microsoft Corp., Redmond, USA) und SPSS für Windows 9.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt ist der Mittelwert +/- Mittelwertabweichung dargestellt. Die Ergebnisse wurden mit dem U-Test von Mann Whitney untersucht und Unterschiede mit weniger als 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit ($p < 0,05$) wurden als signifikant betrachtet. In Abbildungen mit uneindeutigen Ergebnissen sind die signifikanten Ergebnisse markiert, soweit sie für die Aussage des Experiments relevant sind.

III ERGEBNISSE

1 Die Wirkung von IL-1, IL-6, Dex und TNF- α auf die LBP-Expression

Zunächst wurde die Induzierbarkeit der Genexpression von LBP durch IL-1, IL-6 und Dex auf Protein-, RNA-, und Promotorebene untersucht und der Einfluss von TNF- α beurteilt. Außerdem wurden die Mechanismen beleuchtet, die für die Vermittlung der IL-6-Effekte verantwortlich sind.

1.1 Der Einfluss von IL-1, IL-6 und Dex auf Transkription, RNA-Akkumulation und LBP-Synthese

Zunächst wurde die LBP-Proteinkonzentration in den Zellkulturüberständen stimulierter Hepatomzellen mit Hilfe eines humanen LBP-ELISA gemessen. Da LBP sezerniert wird und es keine Hinweise auf eine posttranslationale Regulation von LBP gibt, entspricht die gemessene LBP-Konzentration in den Kulturüberständen der akkumulierten LBP-Proteinbiosynthese.

HepG2-Zellen wurden mit IL-1, IL-6 und Dex in verschiedenen Kombinationen für 48 Stunden stimuliert. Bei der verwendeten Versuchsanordnung (siehe Material und Methoden) konnte keine konstitutive LBP-Expression gemessen werden (Abb. 4).

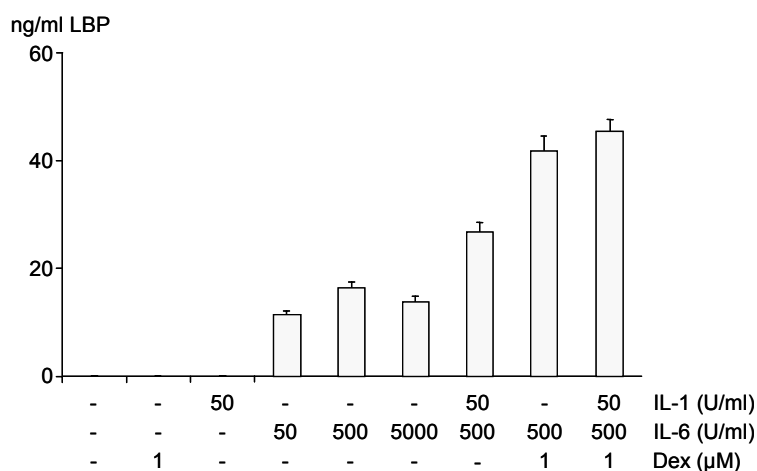


Abb. 4: IL-1, IL-6 und Dex stimulieren die LBP-Expression synergistisch

HepG2-Hepatomzellen wurden mit einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/Loch in einer 24-Lochplatte ausgesät und am nächsten Tag in 200 μ l/well Kulturmedium für 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1, IL-6 und Dex stimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und ein hLBP-ELISA, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Angegeben ist die LBP-Konzentration in den Kulturüberständen.

Eine Wirkung von IL-1 und Dex allein war ebenfalls nicht nachweisbar. Die Inkubation mit IL-6 allein bewirkte eine Zunahme der LBP-Konzentration auf etwa 20 ng/ml LBP, wobei mit 500 U/ml IL-6 die stärkste Stimulation erzielt wurde. Die Kombination von IL-6 mit IL-1 oder Dex ergab eine weitere, deutliche Erhöhung der LBP-Konzentration in den Kulturüberständen. Die maximale LBP-Konzentration wurde nach einer Stimulationsdauer von 48 Stunden gemessen. Nach kürzerer Stimulation (12 und 24 Stunden) konnte ebenfalls LBP-Protein in den Überständen nachgewiesen werden, wobei es aber in geringerer Konzentration als nach 48 Stunden Stimulationsdauer vorlag.

Nach 72 Stunden Inkubationsdauer war die LBP-Konzentration ebenfalls deutlich geringer als nach 48 Stunden (nicht dargestellt). Die Stimulierung der zweiten verwendeten Hepatomzelllinie, HuH-7, führte zum gleichen Stimulationsmuster wie in den HepG2-Zellen (nicht dargestellt). In Bezug auf die untersuchten LBP-Effekte wurde zwischen den Zelllinien in der Regel kein oder kein wesentlicher Unterschied festgestellt. Wurden doch Unterschiede gefunden, wird darauf ausdrücklich hingewiesen.

Um die Wirkungsweise der Stimulanzen auf die LBP-Expression näher zu bestimmen, wurde zunächst die LBP-mRNA-Akkumulation untersucht. Es zeigte sich, dass IL-1, IL-6 und Dex auf die mRNA in ähnlicher Weise wirken wie auf die Proteinexpression. Die Inkubation der Hepatomzellen mit IL-1 und Dex allein hatte nur geringen Einfluss auf die LBP-mRNA-Akkumulation (nicht gezeigt).

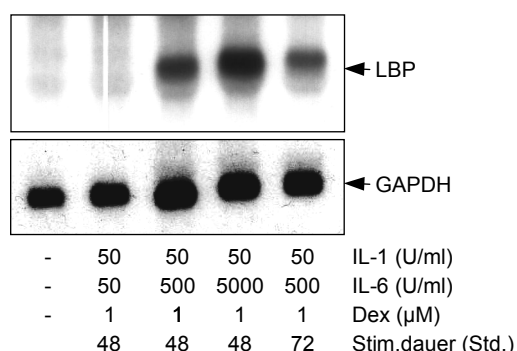


Abb. 5: LBP-mRNA-Akkumulation in stimulierten HuH-7 Zellen

HuH-7-Zellen wurden für 48 bzw. 72 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von IL-1, IL-6 und Dex stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die RNA isoliert. Die Abbildung zeigt einen Northern-Blot, durchgeführt wie in Material und Methoden beschrieben und mit einer ^{32}P - γ -ATP markierten LBP-Sonde hybridisiert. Nach dem Entfernen („Strippen“) der LBP-Sonde wurde der Blot mit GAPDH hybridisiert, dessen RNA-Konzentration als interner Abgleich diente.

Die stärkste Anhäufung von LBP-mRNA wurde nach Stimulierung mit 50 U/ml IL-1, 5000 U/ml IL-6 und 1 µM Dex für 48 Stunden gemessen (Abb. 5). Nach 72 Stunden war die detektierbare mRNA-Konzentration gegenüber dem 48 Stunden-Wert wieder deutlich abgefallen.

Als nächstes wurde die transkriptionelle Aktivität des LBP-Promotors mit Hilfe eines in die Zelllinien transfizierten LBP-Promotor/Luciferase-Konstruktes untersucht (hier mit dem 1780 bp langen 5'-Bereich vor dem Transkriptionsstart des LBP-Gens). Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert und 48 Stunden später die Luciferase-aktivität gemessen, welche sich proportional zu der LBP-Promotoraktivität verhält. Auch hier war das Stimulationsmuster ähnlich dem der Proteinfreisetzung, aber mit kleinen Unterschieden (Abb. 6). IL-6 wirkt stark stimulierend auf den LBP-Promotor und die Kombination mit IL-1 und/oder Dex verstärkt diesen Effekt. Wurden die Zellen mit IL-1 oder Dex alleine inkubiert, zeigte sich zwar ein wesentlich geringerer aktivierender Effekt als bei IL-6, dieser war aber, im Gegensatz zur Protein- und mRNA-Ebene, messbar und lag signifikant über der konstitutiven Aktivität unstimulierter Zellen. Da das Luciferase-Meßsystem besonders sensitiv ist, können hiermit Effekte dargestellt werden, die in den anderen Systemen unter der Nachweisbarkeitsgrenze liegen. Dies deutet darauf hin, dass die Unterschiede der

alleinig IL-1- oder Dex-Wirkung bei den verschiedenen Messsystemen mit Sensitivitätsunterschieden der Methoden erklärt werden können.

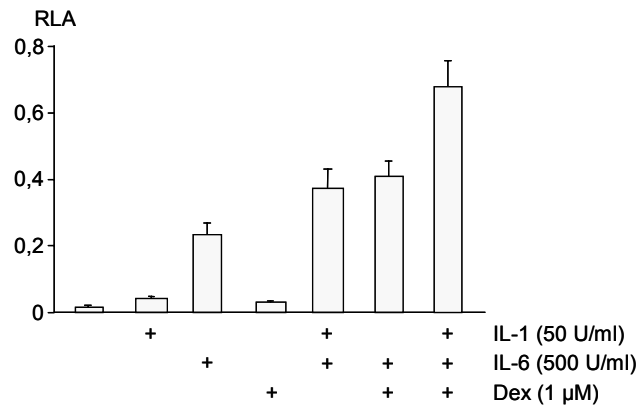


Abb. 6: IL-1, IL-6 und Dex aktivieren die LBP-Promotoraktivität

HepG2-Zellen wurden mit dem vollständigen, 1780 bp langen LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt transfiziert und am darauf folgenden Tag in angegebener Weise mit IL-1, IL-6 und Dex für 48 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die β -Galaktosidase (β -Gal)-Aktivität eines kotransfizierten und konstitutiv exprimierten RSV- β -Gal Vektors wurde ebenfalls gemessen und die Luciferaseaktivität damit normalisiert. Dieses Verhältnis von Luci- zu β -Gal-Aktivität (Luci / β -Gal) wird hier und im folgenden als relative Luciferaseaktivität (RLA) bezeichnet.

1.2 Die Wirkung von TNF- α auf die Aktivität des LBP-Promotors

TNF- α ist ein Zytokin, das typischerweise während einer Sepsis in erhöhter Konzentration im Blutserum vorliegt. Dies und seine bekannte stimulierende Wirkung auf verschiedene Akutphase-Proteine ließen vermuten, dass TNF- α ebenfalls bei der Aktivierung der LBP-Expression mitwirkt. Daher wurde die Wirkung von TNF- α auf die LBP-Promotoraktivität untersucht. Dabei konnten keine wesentlichen Effekte von TNF- α auf die Aktivierung der LBP-Transkription nachgewiesen werden (Abb. 7). Bei Verwendung von 500 U/ml IL-6 und 1 µM Dex schien die Zugabe von 10 ng/ml TNF- α die LBP-Promotoraktivität leicht zu erhöhen. Nach alleiniger Inkubation der Hepatomzelllinien mit TNF- α konnte in keinem Fall ein signifikanter TNF- α -Effekt festgestellt werden. Insgesamt hat TNF- α unter den verwendeten Bedingungen in der Regel offensichtlich keinen nachweisbaren Einfluss auf die Aktivität des LBP-Promotors. Die Untersuchung der TNF- α -Wirkung auf die LBP-Proteinsynthese zeigte ebenfalls keine signifikanten Effekte (nicht dargestellt).

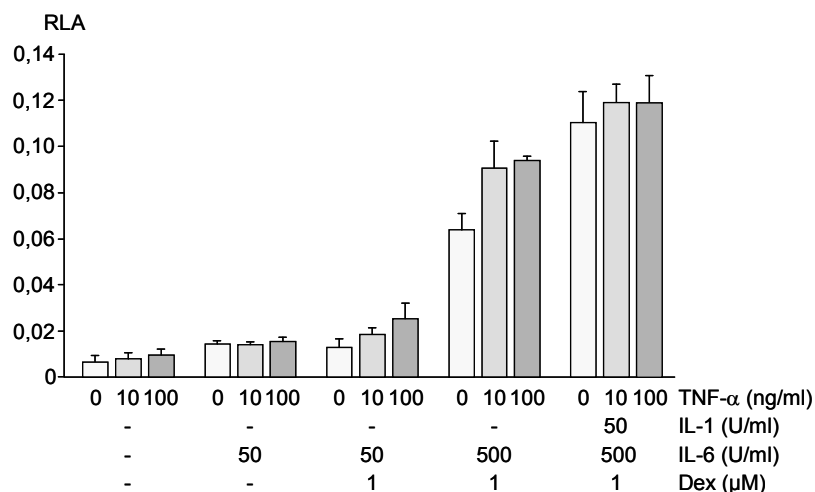


Abb. 7: Der Effekt von TNF- α auf die LBP-Promotoraktivität

HuH-7-Zellen wurden nach der Transfektion mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt wie gezeigt mit IL-1, IL-6 und Dex für 48 Stunden stimuliert und zusätzlich mit TNF- α inkubiert. Die gemessene Luciferaseaktivität ist β -Gal-normalisiert (relative Luciferaseaktivität, RLA).

1.3 Kotransfektion verschiedener C/EBP-Varianten in Hepatomzellen

Im Folgenden wurde die Wirkung von IL-6 auf die Aktivität des LBP-Promotors untersucht. Dazu wurde zusammen mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt der Nukleäre Faktor (NF)-M (das (C)CAAT/enhancer binding protein (C/EBP)- β -Homolog des Huhns) in die untersuchten Zellen kotransfiziert. C/EBP- β ist eines der wichtigsten Ziele der IL-6-Signalketten. Zusätzlich wurde die NF-M 229-Mutante kotransfiziert, die durch einen Aminosäurenaustausch an AS 229 als dominante Negativmutante wirkt.

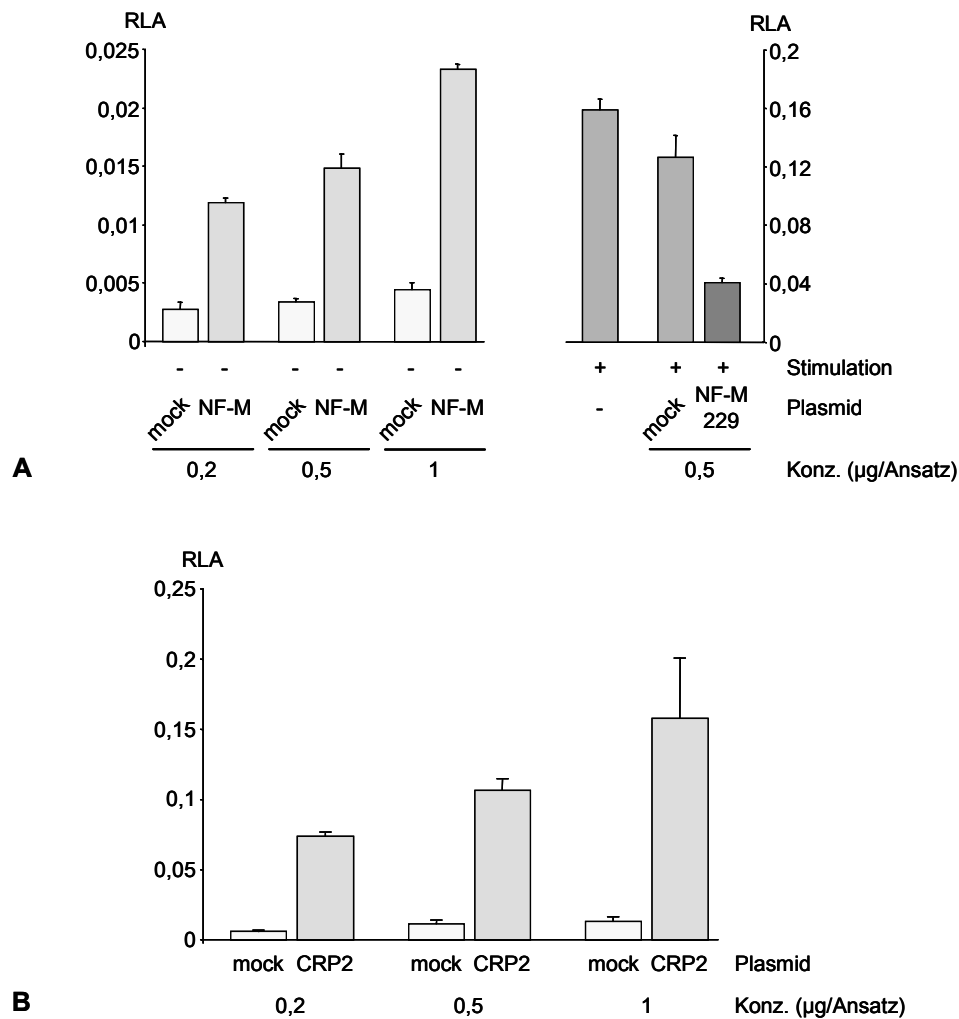


Abb. 8: C/EBP-β von Huhn und Ratte aktivieren den LBP-Promotor

HuH-7-Zellen wurden neben dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt mit den Expressionsvektoren NF-M (C/EBP-β des Huhns, A linke Seite), NF-M 229 (transdominante Negativmutante des NF-M mit einer Mutation bei AS 229, A rechts) und CRP2 (C/EBP-β der Ratte, B) in den angegebenen Konzentrationen transfiziert. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 48 Stunden kultiviert und anschließend die Luciferaseaktivität gemessen. Die mit NF-M 229 transfizierten Zellen wurden zusätzlich am Tag nach Transfektion mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 µM Dex für 48 Stunden stimuliert. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität (RLA).

Durch Kotransfektion von NF-M in steigender Konzentration konnte eine zunehmende LBP-Promotoraktivität nachgewiesen werden (Abb. 8A, linke Teilabbildung). Nach Kotransfektion eines mock-Kontrollvektors, der ein Plasmid ohne das NF-M-Gen darstellt, wurde dagegen nur eine geringe Zunahme der Promotoraktivität erzielt. Die Kotransfektion der dominanten Negativmutanten NF-M 229 führte in stimulierten HuH-7-Zellen zu einer starken Reduktion der Promotoraktivität (Abb. 8A rechter Teil).

Des weiteren konnte bei der Kotransfektion eines Expressionsvektors, der das C/EBP-β der Ratte (CRP2) trägt, ebenfalls eine deutliche Zunahme der LBP-Promotoraktivität nachgewiesen werden (Abb. 8B).

1.4 Mutation von potentiellen C/EBP- β - und Stat-3-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor

Die Analysen des LBP-Promotors in TF-Datenbanken (siehe Mat & Met II.4.1) ergaben eine Vielzahl von möglichen Bindungsstellen für C/EBP- β und Stat-3, den beiden wichtigsten TF, die das IL-6-Signal in den Zellkern vermitteln. Einige der Bindungsstellen wurden mit Hilfe von Mutageneseexperimenten untersucht.

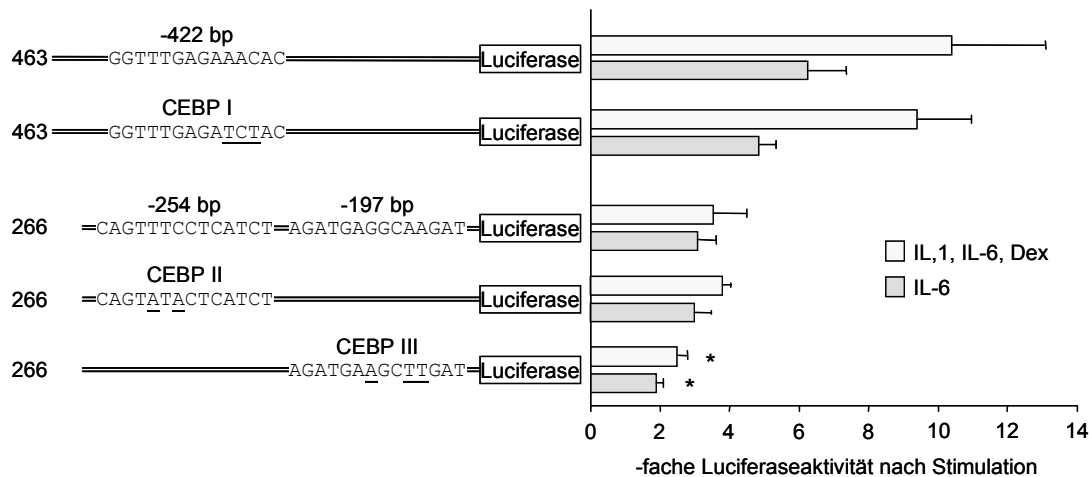


Abb. 9: C/EBP-Bindungsstellen vermitteln die IL-6-induzierte Aktivierung des LBP-Promotors

Drei potentielle C/EBP-Bindungsstellen wurden wie dargestellt durch Punktmutation modifiziert (unterstrichen), wobei die Mutation in trunkierte Promotorelemente eingefügt wurde, um den Einfluss weiterer im 5'-Bereich liegender C/EBP-Elemente auszuschließen. Die LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukte wurden wie dargestellt transfiziert und mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex oder mit 500 U/ml IL-6 für 48 Stunden stimuliert. Die anschließende Luciferasemessung wurde mit β -Gal verrechnet. Dargestellt ist der Quotient der Luciferasemessung aus IL-1, IL-6 und Dex bzw. aus nur IL-6-stimulierten Zellen und der Aktivität aus unstimulierten Zellen. Dadurch erhält man die x-fache Aktivität des stimulierten Promotors verglichen mit dem unstimulierten Promotor. *Signifikanter Unterschied gegenüber wt.

In Abb. 9 sind die drei untersuchten potentiellen C/EBP-Bindungsstellen mit wt-Sequenz und eingefügter Mutation dargestellt. Die Aktivität des wt- und des mutierten Promotors nach maximaler Stimulation bzw. nach Stimulation mit IL-6 ist im Verhältnis zur Promotoraktivität in unstimulierten Zellen dargestellt (stimuliert / unstimuliert = x-fache Aktivität). Die Ergebnisse zeigen eine signifikant verringerte Promotoraktivität nach maximaler und nach IL-6-Stimulation bei Verwendung der CEBP III-Mutanten. Bei den potentiellen C/EBP- β -Bindungsstellen CEBP I und II konnte hingegen kein signifikanter Einfluss auf den Promotor nachgewiesen werden.

Zwei potentielle Stat-3-Bindungsstellen wurden ebenfalls mutiert und die relative Luciferaseaktivität aus stimulierten und unstimulierten Zellen ins Verhältnis gesetzt (Abb. 10).

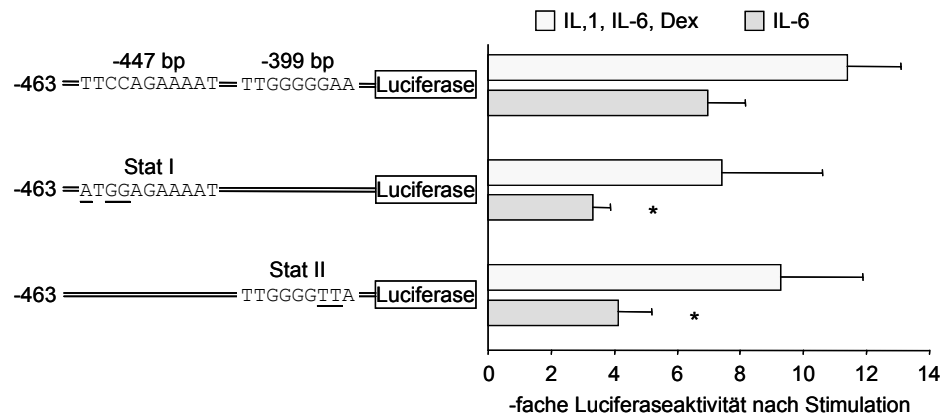


Abb. 10: Analyse von zwei Stat-3-Bindungsstellen

Zwei potentielle Stat-3-Bindungsstellen (Stat I bei -447 bp und Stat II bei -399 bp) wurden in der LBP-Promotor-Trunkation -463 bp mutiert. Die x-fache Promotoraktivität nach Stimulation mit IL-6 oder IL-1, IL-6 und Dex wurde im Vergleich zu der Aktivität im unstimulierten Promotor ermittelt. *Signifikanter Unterschied gegenüber wt mit gleicher Stimulation

Hier zeigte sich ein Einfluss dieser Bindungsstellen besonders auf die Promotoraktivität nach IL-6-Stimulation. Beide Mutationen, Stat I und Stat II, führten dabei zu einer deutlichen Herabsetzung der Aktivität. Nach maximaler Stimulation mit IL-1, IL-6 und Dex konnte hingegen keine signifikante Reduzierung der Promotoraktivität nachgewiesen werden.

1.5 Die Rolle von AP-1-Bindungsstellen im LBP-Promotor

Von AP-1, einem TF, der sowohl Endpunkt der IL-6- als auch der IL-1-Signaltransduktion sein kann, befinden sich ebenfalls eine Vielzahl potentieller Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor. Sechs dieser möglichen Bindungsstellen wurden untersucht und im folgenden mit AP I bis AP VI bezeichnet (Abb. 11). In der Regel wurden Punktmutationen eingefügt, lediglich bei AP IV wurde der relevante Bereich komplett deletiert. Auch hier ist die x-fache Promotoraktivität nach Stimulierung im Vergleich zu unstimulierten Zellen dargestellt, jeweils beim wt und beim wie angezeigt mutierten Promotor.

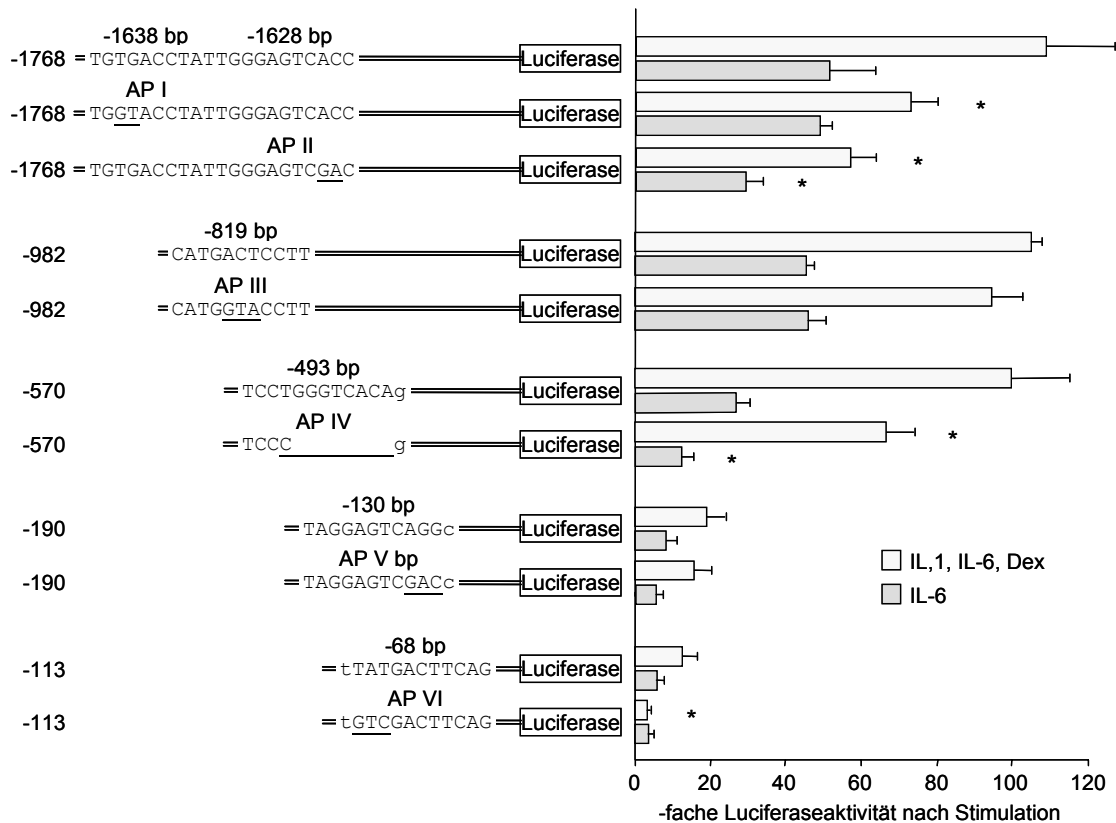


Abb. 11: AP-1-Bindungsstellen vermitteln die Aktivierung des LBP-Promotors

Sechs potentielle AP-1-Bindungsstellen wurden, wie in der linken Hälfte der Abbildung dargestellt, mutiert. Die Konstrukte wurden in HuH-7-Zellen transfiziert und für 48 Stunden mit IL-6 (500 U/ml) oder IL-1 (50 U/ml), IL-6 (500 U/ml) und Dex (1 µM) stimuliert. Dargestellt ist die x-fache Promotoraktivität der stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

*Signifikanter Unterschied gegenüber wt mit gleicher Stimulation

Nach Mutationen der Loci AP I und AP II konnte nach maximaler Stimulierung mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 µM Dex eine klar verminderte Promotoraktivität gegenüber dem wt-Promotor nachgewiesen werden. Nach alleiniger IL-6-Stimulation wurde nur in AP II eine reduzierte Promotoraktivität detektiert. Die potentielle AP-1-Bindungsstelle bei -819 bp (Mutation AP III) scheint keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des LBP-Promotors zu haben. Die Mutation AP IV reduziert die Promotoraktivität sowohl nach IL-6-Stimulation als auch nach maximaler Stimulation. Die Effekte bei AP V sind nicht signifikant, bei AP VI hingegen konnte eine deutliche Reduzierung der Promotoraktivität nach maximaler Stimulierung gezeigt werden.

2 Die Vermittlung der IL-1-Effekte auf die LBP-Expression

Wie in Abb. 6 gezeigt wurde, hat auch IL-1 allein eine stimulierende Wirkung auf die LBP-Promotoraktivität, entfaltet aber seine volle Wirkung erst in Synergie mit IL-6. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die maximale Wirkung von IL-1 bei einer Konzentration von 50 U/ml erreicht wird (nicht dargestellt). Im Folgenden sollen die Ursachen der IL-1-Wirkung genauer untersucht werden.

2.1 IL-1-Effekte in der Signaltransduktion von Hepatomzellen

In den Hepatomzellen wurden unterschiedliche Signalübertragungswege untersucht, die bekanntermaßen durch IL-1 aktiviert werden können. Dazu wurde zunächst die Aktivität von p44/42 mit einem Analysesystem von Amersham untersucht, das den Transfer von ^{32}P auf ein spezifisches Peptid, also direkt die Kinaseaktivität von p44/42 misst. Nach Inkubation mit 50 U/ml IL-1 für 20 min konnte eine deutliche Aktivierung der p44/42-Kinaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 12).

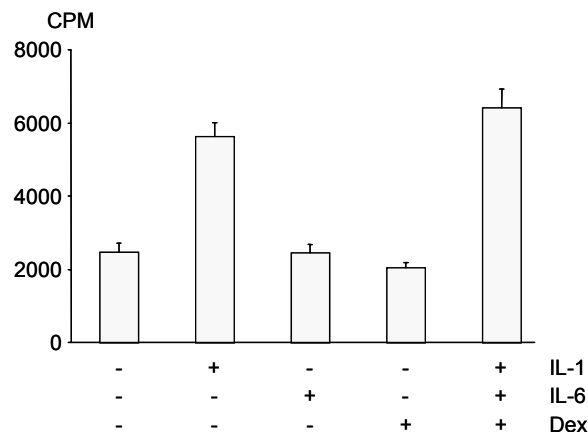


Abb. 12: Aktivierung der p44/42-Kinaseaktivität in Hepatomzellen

HuH-7-Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μM Dex wie angezeigt für 20 min stimuliert und die zytoplasmatischen Proteine isoliert. Die Messung der p42/44-Kinaseaktivität erfolgte mit einem Messsystem von Amersham. Dabei wird das ^{32}P -Isotop aus ^{32}P - γ -ATP auf ein spezifisches Peptid übertragen. Die Transferrate, bestimmt im Szintillationszähler (counts per minute, CPM), entspricht dabei der enzymatischen Aktivität von p44/42 (Mittel aus Dreifachwerten \pm Standardabweichung).

Die Inkubation mit IL-6 (500 U/ml) alleine und Dex (1 μM) alleine führte zu keiner erhöhten Kinaseaktivität. Die Kombination der drei Stimulanzien führte zur gleichen p44/42-Aktivität wie nach Inkubation mit IL-1 allein. Demnach ist von den untersuchten Stimulanzien allein IL-1 in der Lage, in den Hepatomzellen den p44/42-Signalweg zu aktivieren.

Die Aktivierung der Kinase p38, ebenfalls ein Glied eines bekannten IL-1-Signalwegs, erfolgt durch Phosphorylierung. Dieses phospho-p38 wurde durch spezifische Antikörper, die nur an phosphoryliertes p38 binden können, im Western-Blot detektiert. Auch hier erfolgte die Aktivierung ausschließlich nach IL-1-Inkubation. Die Kombination von IL-1, IL-6 und Dex führte zu etwa dem

gleichen Effekt wie nach alleiniger IL-1-Inkubation (Abb. 13). Die Detektion der p38-Kinase diente als Ladekontrolle.

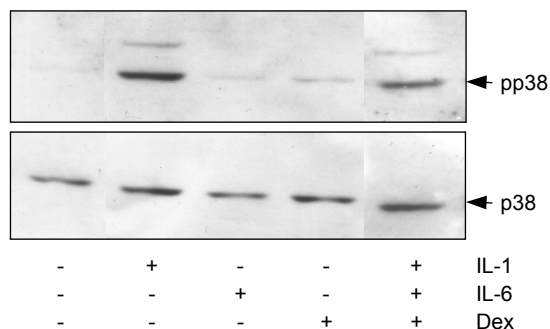


Abb. 13: IL-1-Inkubation steigert die Phosphorylierung von p38 (pp38)

HepG2-Zellen wurden für 20 min mit IL-1 (50 U/ml), IL-6 (500 U/ml) und Dex (1 μ M) wie angezeigt stimuliert. Die zytoplasmatischen Proteine wurden isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und fixiert. Die p38-Kinase bzw. die phosphorylierte p38-Kinase (pp38) wurde durch spezifische Antikörper nachgewiesen.

Dagegen ergaben sich bei der Untersuchung der Aktivierbarkeit (Phosphorylierung) von JNK durch IL-1, IL-6 und Dex Unterschiede im Induktionsmuster: Auch hier stimulierte IL-1 die Phosphorylierung von JNK, und die Inkubation von IL-6 und Dex alleine zeigte keine Effekte auf JNK. Nach Stimulierung mit IL-1, IL-6 und Dex allerdings war die Phosphorylierung gegenüber der Stimulation mit IL-1 alleine deutlich erhöht. Demnach verstärkten IL-6 und Dex die Wirkung von IL-1, obwohl sie allein keinen detektierbaren Effekt zeigen (Abb. 14).

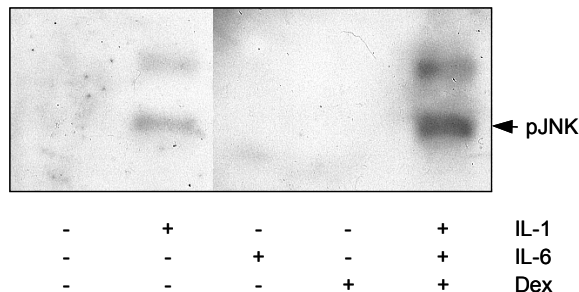


Abb. 14: IL-1 aktiviert JNK und wirkt mit IL-6 synergistisch

HuH-7 Zellen wurden für 20 min wie angezeigt mit IL-1 (50 U/ml), IL-6 (500 U/ml) und Dex (1 μ M) stimuliert, die zytoplasmatischen Proteine isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, und auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde der Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes JNK (pJNK) inkubiert.

Typischerweise enden die hier untersuchten IL-1-Signalwege beim TF AP-1. Der Einfluss von AP-1 auf den LBP-Promotor wurde schon in Abschnitt 1.5 untersucht, da AP-1 ebenfalls IL-6-Effekte vermittelt.

2.2 Der NF- κ B-Signalweg in Hepatomzelllinien

Ein zweiter wichtiger Pfad für die Übermittlung des IL-1-Effekts ist der NF- κ B-Signalweg. Da auf dem LBP-Promotor mehrere Bindungsstellen, die eine hohe Übereinstimmung mit der NF- κ B-Konsensussequenz aufweisen gefunden wurden, wurden die NF- κ B-Signaltransduktion und die

Aktivität der potentiellen NF- κ B-Bindungsstellen auf dem Promotor untersucht. Zuerst wurde getestet, ob in den beiden verwendeten Hepatomzelllinien HepG2 und HuH-7 der NF- κ B-Weg aktiv ist. Dazu wurden die Zellen mit einem ELAM-Luciferase-Plasmid transfiziert, das vor dem Luciferasegen einen Promotor trägt, der mehrere NF- κ B-Bindungsstellen aufweist. Die Aktivierung des NF- κ B-Wegs führt so in diesem Assay zu einer erhöhten Luciferasesynthese.

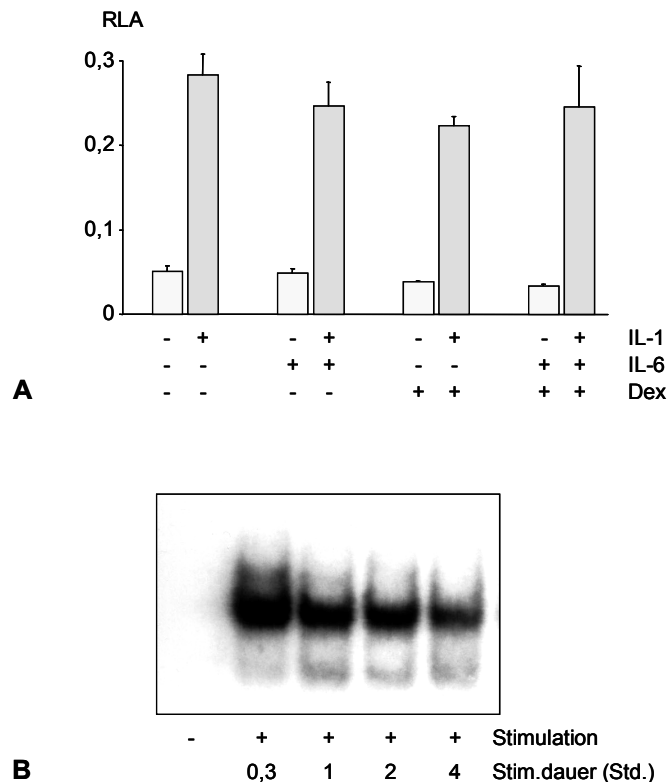


Abb. 15: Der NF- κ B-Signalweg ist in HuH-7-Hepatomzellen aktiv

A: HuH-7-Zellen wurden mit dem ELAM/Luciferase-Konstrukt transfiziert, am nächsten Tag für 48 Stunden mit IL-1 (50 U/ml), IL-6 (500 U/ml) und Dex (1 μ M) stimuliert und anschließend die Luciferaseaktivität bestimmt. Dargestellt ist die β -Gal-normalisierte, relative Luciferaseaktivität (RLA). B: HuH-7-Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex für 20 min bis 4 Stunden stimuliert und anschließend die nukleären Proteine isoliert. 4 μ g nukleäre Proteine wurden mit einem 32 P- γ ATP-markierten Oligonukleotid, das die Konsensussequenz von NF- κ B trägt, für 30 min inkubiert und anschließend elektrophoretisch von ungebundenen Oligonukleotiden getrennt. Die Abbildung zeigt die NF- κ B-spezifische Bande nach Stimulation über den angegebenen Zeitraum.

Nach Stimulation und Transfektion von ELAM konnte gezeigt werden, dass NF- κ B durch IL-1 in den Hepatomzelllinien HuH-7 (Abb. 15A) und HepG2 (nicht dargestellt) aktivierbar ist und IL-6 und Dex auf NF- κ B keinen Einfluss haben. Bestätigt wurde die Aktivierbarkeit von NF- κ B durch die Stimulierung der Zellen für 20 min bis 4 Stunden und die anschließende Analyse mit der EMSA-Technik. Hierbei zeigte sich die typische NF- κ B-Wirkung nach Stimulierung. Die maximale Aktivierbarkeit trat dabei schon nach 20 min ein und nahm danach, ohne ein Plateau zu bilden, wieder ab (Abb. 15B).

2.3 Die Aktivierbarkeit des LBP-Promotors durch p65

NF- κ B kann sich aus verschiedenen Monomeren zusammensetzen: Typischerweise besteht es aus einem p50- und p65-Heterodimer; Homodimere aus zwei p65-Untereinheiten sind ebenfalls aktiv, während p50-Homodimere inaktiv sind. Um die direkte Wirkung von NF- κ B auf den LBP-Promotor untersuchen zu können, wurde zusammen mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt ein p65-Expressionsvektor in verschiedenen Konzentrationen in die verwendeten Zellen transfiziert (Abb. 16).

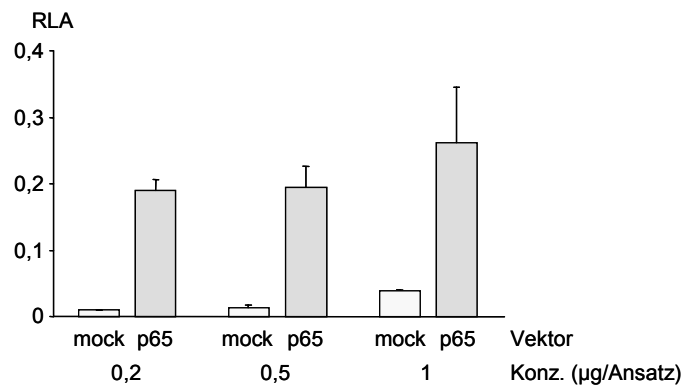


Abb. 16: Expressionsvektor p65 erhöht die LBP-Promotoraktivität

Der LBP-Promotor/Luciferase-Vektor wurde zusammen mit einem p65-Expressionsvektor wie angegeben in verschiedenen Konzentrationen in HuH-7-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden Kultivierung wurde die Luciferaseaktivität gemessen und β -Gal-normalisiert (relative Luciferaseaktivität, RLA)

Die Expression von p65 bewirkt dabei eine Erhöhung der LBP-Promotoraktivität um das 7- bis 20-fache gegenüber der stimulierenden Aktivität des mock-Kontrollvektors, der kein p65-Gen beinhaltet.

2.4 NF- κ B-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor

Zwei von mehreren potentiellen NF- κ B-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor wurden durch Mutationsexperimente untersucht. Sowohl die Mutation NF- κ B I (-1701 bp) als auch NF- κ B II (-515 bp) hatten einen deutlichen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des LBP-Promotors (Abb. 17). Nach der Stimulation der Zellen mit IL-1, IL-6 und Dex waren die beiden mutierten LBP-Promotoren bis zu 50 % geringer stimulierbar als die entsprechenden Trunkationen des wt-Promotors. Nach Stimulation mit IL-6 allein zeigte sich, wie zu erwarten, keine signifikante Abnahme der Aktivität in den mutierten Promotoren. Nach Stimulation der NF- κ B-Mutanten mit IL-1 alleine zeigte sich regelmäßig ein Abfall der Promotoraktivität gegenüber den wt-Trunkationen. Die NF- κ B-Bindungsstelle NF κ B II, die den stärksten Effekt auf die Aktivierbarkeit des Promotors zeigte, wurde mit Hilfe von EMSA weiter untersucht. Die Inkubation der nukleären Proteine mit einem Oligonukleotid, das die Basensequenz des LBP-Promotors an dieser Bindungsstelle trägt, führte zu einer DNA-Protein-Interaktion („shift“; Abb. 18).

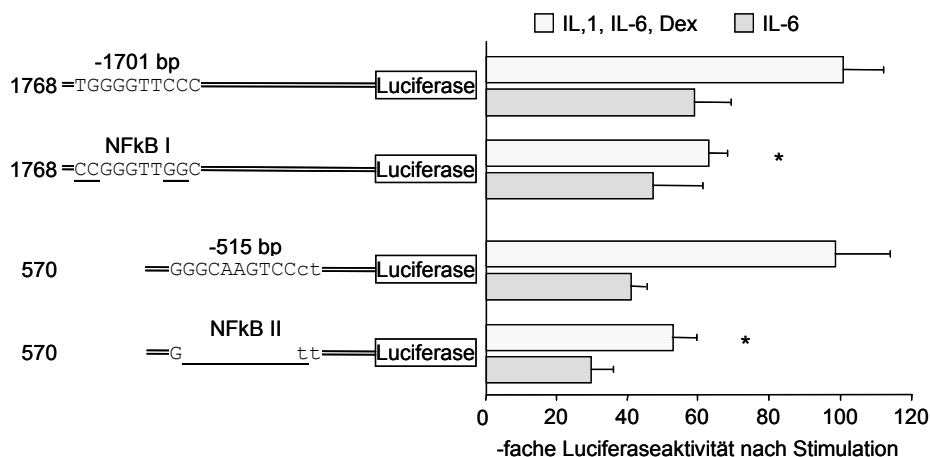


Abb. 17: NF-κB-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor sind aktiv

Zwei potentielle NF-κB -Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor wurden mutiert: Bei NFκB I (–1701 bp) wurden Punktmutationen eingefügt, bei NFκB II (–515 bp) wurde die Bindungsstelle deletiert. Die beiden Mutationen wurden in trunkierte LBP-Promotorelemente eingefügt, die die Bindungsstellen nahe an ihrem 5'-Ende tragen. Die mutierten Promotoren und die wt-Trunkationen wurden in HuH-7 Zellen transfiziert und am nächsten Tag mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μM Dex oder mit 500 U/ml IL-6 für 48 Stunden stimuliert und anschließend die Luciferaseaktivität gemessen. Dargestellt ist die x-fache Promotoraktivität. *Signifikanter Unterschied gegenüber wt mit gleicher Stimulation.

Diese Bindung war, wie durch Kompetitionstests gezeigt werden konnte, NF-κB-spezifisch. Mit Hilfe zusätzlicher Antikörper-Inkubation („Supershifts“) wurde nachgewiesen, dass die NF-κB-Monomere p50 und p65 an die DNA binden.

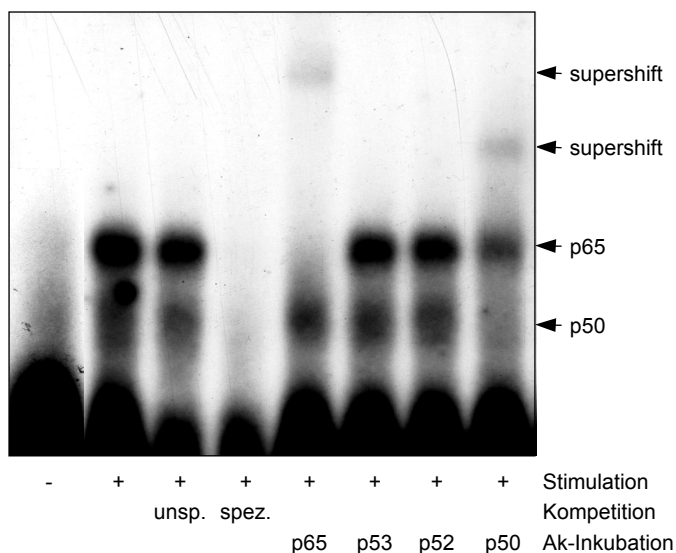


Abb. 18: Die potentielle NF-κB-Bindungsstelle NFκB II bindet spezifisch p50 und p65

HepG2 Zellen wurden für 20 min mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μM Dex stimuliert und anschließend die nukleären Proteine isoliert. Ein ³²P-markiertes Oligonukleotid, das die LBP-Promotorsequenz bei –515 repräsentiert (NFκB II), wurde mit den nukleären Proteinen inkubiert. Zusätzlich wurde mit nicht markierten, „kalten“ Oligonukleotiden inkubiert, welche die LBP-Sequenz bei –515 bp (spez.) oder eine zufällige Sequenz (unsp.) enthielten. Weiterhin wurden die Proben mit den Antikörpern Ak p65, Ak p53, Ak p52 und Ak p50 inkubiert um den sogenannten „Supershift“ zu erzielen.

3 Die Ursachen der Dexamethason-Wirkung auf die LBP-Expression

Wie aus Abb. 4 und Abb. 5 zu ersehen ist, führte die Inkubation von Dex bei IL-6-stimulierten Zellen zu einer zusätzlichen Aktivierung des LBP-Promotors bzw. der Proteinsynthese. Wurden die Hepatomzelllinien nur mit Dex inkubiert, war hingegen bei der Promotoraktivität eine geringe Steigerung und auf Proteinebene kein Effekt zu beobachten. Die Stimulation der Hepatomzellen mit verschiedenen Dex-Konzentrationen ergab eine Zunahme der LBP-Expression bis zu einer Konzentration von 1 μ M. Die Inkubation mit 3 μ M Dex führte in der Regel zu keiner weiteren Erhöhung der LBP-Expression und höhere Dex-Konzentrationen zur Abnahme der stimulierenden Dex-Wirkung (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.1 Dex-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor

Schon bei ersten Analysen des LBP-Promotors mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren-Datenbank SigScan, Version 4.05 (siehe Material & Methoden) wurden zwei potentielle „glucocorticoid responsive elements“ (GREs) identifiziert. Um zu überprüfen, ob diese beiden Elemente an der Vermittlung der Dex-Wirkung beteiligt sind, wurden jeweils zwei Punktmutationen eingefügt. Überraschenderweise zeigte sich dabei, dass beide Mutationen der GREs nicht zu einer Reduktion der Dex-Wirkung führten, sondern im Gegenteil dessen Effekte noch verstärkten (Abb. 19). Demnach vermitteln die beiden mutierten Bindungsstellen eine hemmende Wirkung von Dex. Dieser Effekt ist nach IL-1- und IL-6-Stimulation +/- Dex signifikant und wurde nach IL-6 Stimulation +/- Dex im Trend bestätigt.

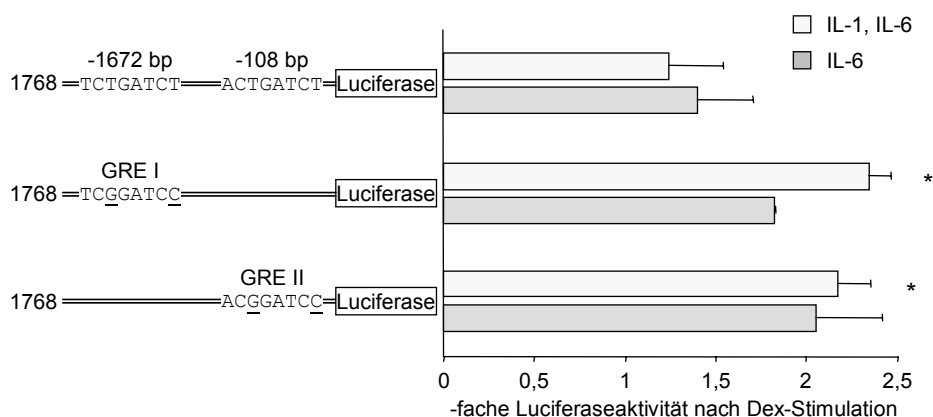


Abb. 19: Zwei GRE-Bindungsstellen vermitteln eine Hemmung des LBP-Promotors

Der vollständige LBP-Promotor mit einer Länge von 1768 bp wurde an den Positionen –1672 bp und –108 bp an den unterstrichenen Stellen mutiert. Die beiden mutierten LBP-Promotor/Luciferasekonstrukte wie auch der wt-Promotor wurden in HuH-7 transfiziert und für 48 Stunden mit IL-6 und IL-1 + IL-6 jeweils mit und ohne 1 μ M Dex stimuliert. Die Grafik zeigt die x-fache Promotoraktivität nach Dex-Inkubation. Stimuliert wurde mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex.

*Signifikanter Unterschied gegenüber wt mit gleicher Stimulation.

Die inhibierende Wirkung der GRE I-Bindungsstellen konnte durch den Vergleich des vollständigen Promotors mit einer Trunkation des LBP-Promotors, die die GRE I-Bindungsstelle nicht enthält, bestätigt werden. Dieses Promotorfragment zeigte in etwa die gleiche Zunahme der

Promotoraktivität nach Inkubation mit Dex wie der vollständige Promotor mit der mutierten GRE I-Bindungsstelle, verglichen mit dem wt-Promotor (nicht dargestellt).

Wenn die aktivierende Wirkung von Dex auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, müssten auf dem Promotor weitere Dex-Bindungsstellen vorhanden sein, die eine aktivierende Wirkung vermitteln und dadurch die inhibierende Wirkung der beiden untersuchten Bindungsstellen überlagern. Um dies zu verifizieren, wurde mit MatInspector und anderen Datenbanken nach weiteren potentiellen Glukokortikoid-bindenden Regionen gesucht. Drei der neu gefundenen potentiellen GR-Bindungsstellen wurden mutiert, wobei hierbei die Mutationen in trunkierte Promotorelemente eingefügt wurden, so dass die jeweilige GR-Bindungsstelle nah am 5'-Ende lag (Abb. 20). Nach Mutation der GRE III-Bindungsstelle (-788 bp) war die Responsivität des Promotors gegenüber Dex deutlich herabgesetzt, d.h. hier wird tatsächlich eine stimulatorische Dex-Wirkung vermittelt. Die GRE IV-Bindungsstelle (-417 bp) vermittelte ebenfalls einen schwachen, aber signifikanten stimulatorischen Dex-Effekt. Die dritte Mutation (GRE V, -185 bp) zeigte keinen Einfluss auf die Promotoraktivität. Im unmutierten 266 bp kurzen Promotorfragment wurde kein stimulierender Dex-Effekt mehr beobachtet, entsprechend sind hier auch keine aktiven, stimulatorisch wirkenden Bindungsstellen zu erwarten.

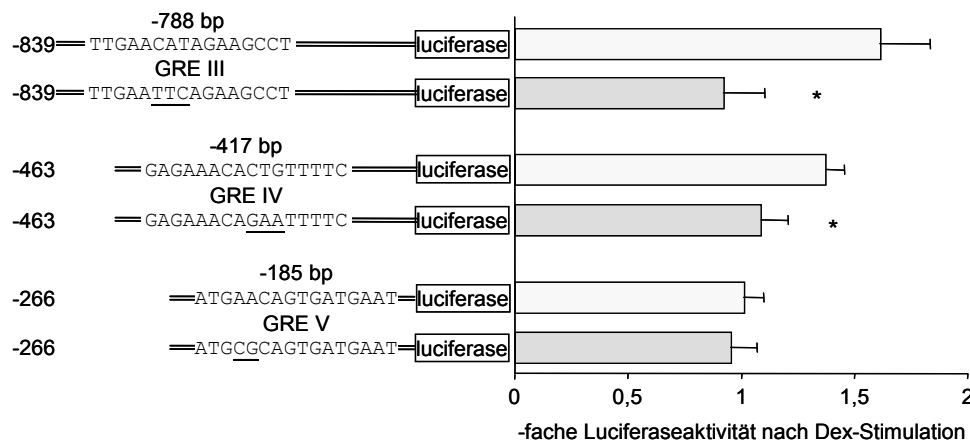


Abb. 20: Analyse weiterer potentieller GRE-Bindungsstellen

Die Punktmutationen wurden wie dargestellt an den potentiellen GRE-Bindungsstellen in trunkierte LBP-Promotorelemente eingefügt und anschließend in HepG2-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und +/- 1 µM Dex stimuliert. Angegeben ist das Verhältnis der Promotoraktivität nach Stimulation + Dex zu der Aktivität nach Stimulation - Dex. *Signifikanter Unterschied gegenüber wt.

3.2 Die Wirkung von NF-IL6-Vektoren auf die Dex-Aktivität

Um die Dex-Wirkung auf den LBP-Promotor weiter zu untersuchen, wurden die unter Abschnitt 1.3 beschriebenen, aktiven NF-IL6-Expressionsvektoren der Ratte (CRP2) und des Huhns (NF-M) mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt in die Hepatomzellen transfiziert und anschließend mit Dex stimuliert. Wie in Abb. 21 gezeigt, ergab sich in IL-6-stimulierten Zellen nach zusätzlicher Inkubation mit Dex wie zu erwarten eine Zunahme der Promotoraktivität um das 1,6-fache. Bei beiden transfizierten Vektoren führte die zusätzliche Inkubation mit Dex zu keinem Anstieg der

Promotoraktivität, im Gegenteil war bei bestimmten Dex-Konzentrationen eine Reduktion der Vektoreffekte zu beobachten.

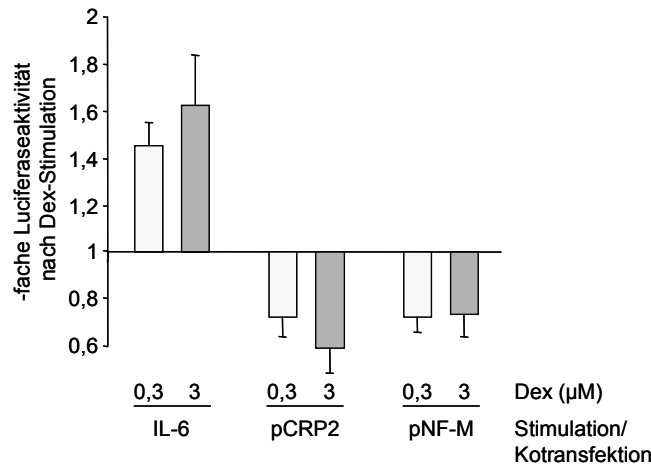


Abb. 21: NF-IL6-Transfektion und Dex-Inkubation

Die Zelllinie HuH-7 wurde mit dem LBP-Promotorkonstrukt transfiziert und zusätzlich mit jeweils 1 µg/Ansatz Expressionsvektor NF-IL6 vom Huhn (NF-M) oder der Ratte (CRP2) kotransfiziert. Am nächsten Tag wurde mit 0, 0,3 und 3 µM Dex für 48 Stunden stimuliert; zusätzlich wurde als Kontrolle mit IL-6 (ohne Kotransfektion) stimuliert. Dargestellt ist die x-fache Promotoraktivität nach Dex-Inkubation im Vergleich zu den Ansätzen ohne Dex.

3.3 Der Einfluss von Dex auf die Expression des IL-6-Rezeptors und von gp130

Zum einen konnten durch die Mutationsexperimente zwar aktive Dex-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor nachgewiesen, aber der im Gesamtsystem stimulatorische Dex-Effekt damit nicht hinreichend erklärt werden. Zum anderen führte die Transfektion der NF-IL6-Vektoren, die letztlich ein Überspringen der IL-6-Signalwege darstellen, zu keinem Synergieeffekt mit Dex. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob der IL-6-Dex-Synergieeffekt weiter aufwärts in der IL-6-Signalkette zu lokalisieren ist. Dazu wurde der mögliche Einfluss von Dex auf die Expression des IL6-R untersucht.

Die Hepatomzelllinien wurden dabei für 30 min bis 8 Stunden mit Dex stimuliert, und anschließend wurde mit einem anti-IL6-R Antikörper in Kombination mit einem FITC-markierten IgG-Antikörper die IL6-R-Expression in einem FACS-Messsystem detektiert. Auf gleiche Weise wurde der IL6-R-Korezeptor gp130 untersucht. Die Dex-Inkubation führte schon nach 30 min zu einem deutlichen Anstieg der Expression des IL6-R und erreichte nach zwei Stunden ein Maximum. Nach acht Stunden war die IL6-R-Konzentration wieder nahe der Ausgangskonzentration. Die Konzentrationsänderung des Korezeptors gp130 auf der Zelloberfläche zeigte von einem niedrigeren Niveau startend einen ähnlichen Verlauf wie der IL6-R (Abb. 22).

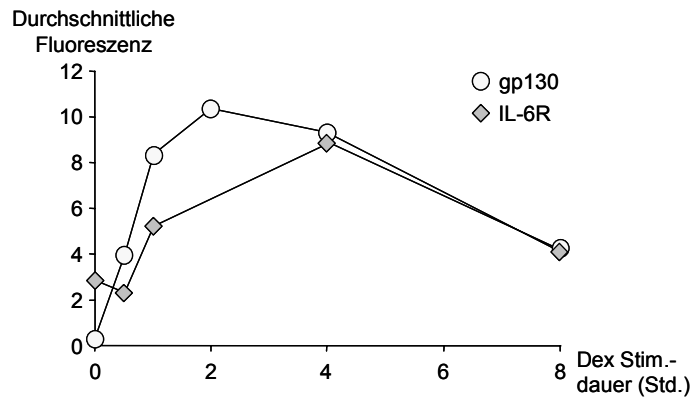


Abb. 22: Der Einfluss von Dex auf die Expression von IL-6R und gp130

HepG2-Zellen wurden mit 1 μ M Dex für 0 bis 8 Stunden stimuliert und anschließend jeweils mit einem Antikörperpärchen inkubiert, das der Detektion von IL-6R und gp130 diente. Aus der sich anschließenden FACS-Messung wurden die durchschnittlichen Fluoreszenzwerte grafisch dargestellt.

3.4 Die Wirkung von Dex auf den IL-6-induzierbaren Stat-Signalweg

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Expression des IL-6R ebenfalls zu einer Aktivierung der sich anschließenden Signaltransduktionskette führt, wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analyse die Aktivierung von Stat-1 und -3, typische Vertreter des IL-6-Signalwegs, untersucht. Stat-1 und Stat-3 werden durch Phosphorylierung aktiviert, die durch spezifische Ak nachgewiesen werden kann.

Die Hepatomzellen wurden 20 min bis 24 Stunden mit Dex vorinkubiert und anschließend für 20 min mit IL-6 stimuliert. Die Inkubation von 50, 500 und 5000 U/ml IL-6 für 20 min ergab bei steigender Konzentration eine deutliche Zunahme von phosphoryliertem Stat-3 (pStat-3, Abb. 23A). Die zusätzliche Vorinkubation mit 1 μ M Dex führte bei zunehmender Vorinkubationsdauer von 20 min bis 24 Stunden zu einer zeitabhängigen Zunahme von pStat-3.

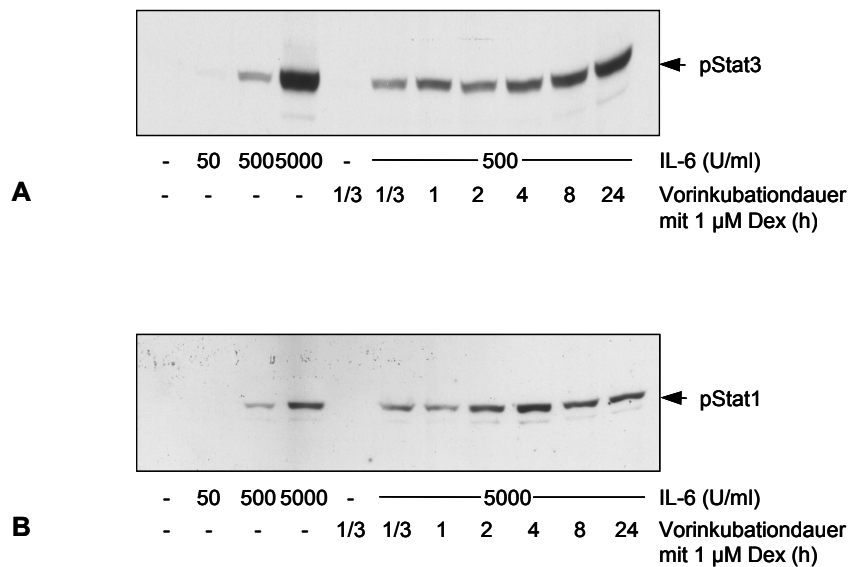


Abb. 23: Dex stimuliert die Aktivierung von Stat-1 und Stat-3 in HuH-7-Zellen

HuH-7-Zellen wurden mit 50, 500 oder 5000 U/ml IL-6 für 20 min behandelt. Davor wurden die Zellen wie dargestellt von 20 min bis 24 Stunden mit 1 µM Dex vorinkubiert. Die anschließend isolierten zytoplasmatischen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylonmembran fixiert. Die Detektion von pStat-1 und pStat-3 erfolgte mit spezifischen Antikörpern, wie in Material und Methoden beschrieben.

Die Phosphorylierung von Stat-1 (pStat-1) durch IL-6 konnte ebenso nachgewiesen werden wie die Steigerung dieser Aktivierung durch Vorinkubation mit Dex. Allerdings waren dafür 10x höhere IL-6 Konzentrationen notwendig als bei der Stat-3-Phosphorylierung (Abb. 23B).

4 Die Wirkung von IL-10 und TGF- β 1 auf die LBP-Expression

Um die Regulation von LBP zu studieren, erschien es wichtig, auch nach Substanzen zu suchen, die die LBP-Expression hemmen. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 die LBP-mRNA-Transkriptakkumulation in stimulierten Hepatomzellen unterdrückt [75]. IL-10 ist ebenfalls ein Zytokin mit vielfach beschriebenen inhibierenden Eigenschaften und sollte daher ebenfalls ein aussichtsreicher Kandidat für die Vermittlung hemmender Effekte sein. Zunächst wurde die Wirkung von IL-10 untersucht und anschließend die LBP-hemmenden TGF- β 1-Effekte analysiert.

4.1 Analyse von IL-10-Effekten auf die LBP-Expression

Die Hepatomzelllinien wurden mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt transfiziert, anschließend mit IL-1, IL-6 und Dex stimuliert und gleichzeitig mit verschiedenen Konzentrationen von IL-10 inkubiert.

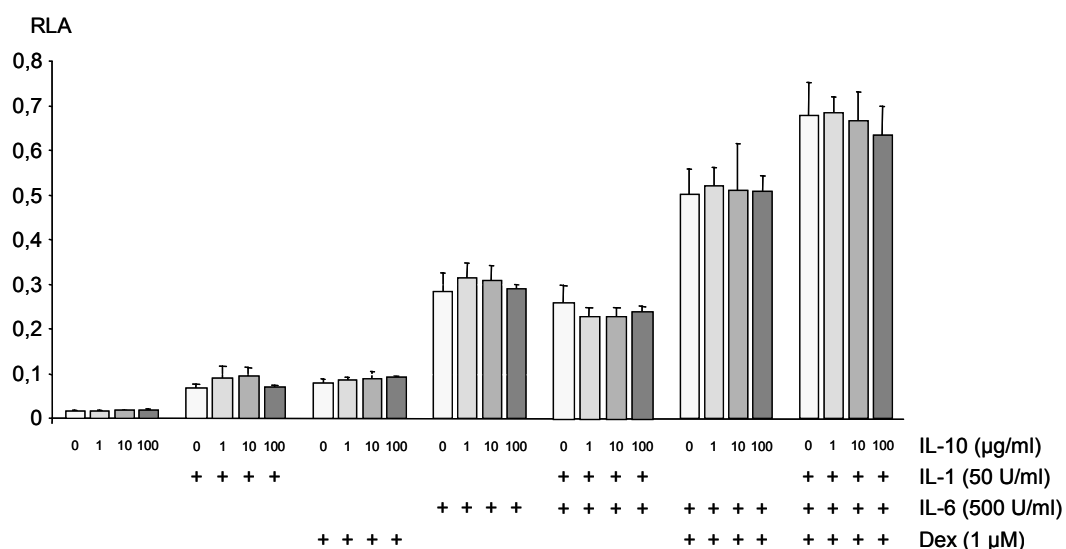


Abb. 24: IL-10 hat keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von LBP in Hepatomzellen

HuH-7 Zellen wurden mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt transfiziert und wie angegeben für 48 Stunden mit IL-1, IL-6 und Dex stimuliert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit 0, 1, 10 oder 100 µg/ml IL-10 inkubiert. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität (RLA).

Weder die Inkubation der HuH-1 Zellen mit IL-10 allein noch die Inkubation zusammen mit IL-1, IL-6 und Dex in verschiedenen Kombinationen führte zu einer signifikanten Wirkung von IL-10 (Abb. 24). Die Vorinkubation von IL-10 für eine oder vier Stunden oder die IL-10-Inkubation nach Gabe der Stimulanzen zeigte ebenfalls keine Wirkung (nicht dargestellt). Die Inkubation der Hepatomzelllinie HepG2 mit IL-10 unter stimulierten und unstimulierten Konditionen führte ebenfalls zu keiner messbaren IL-10-Wirkung (ebenfalls nicht dargestellt). Um mögliche posttranskriptionelle IL-10-Effekte erkennen zu können, wurden die Versuche mit beiden Zelllinien wiederholt und die LBP-Konzentration mit dem hLBP-ELISA bestimmt. Auch hier zeigten sich keinerlei IL-10-Effekte auf die LBP-Expression (nicht dargestellt). Da in der Literatur IL-10-Effekte

in HepG2-Zellen beschrieben sind (siehe Diskussion) und in Zellkulturlinien auf Grund von Mutationen Störungen von Signalwegen auftreten können, wurde die HepG2-Zelllinie von DSMZ (Braunschweig) neu bezogen. Die wiederholten Versuche mit der neu etablierten HepG2-Zelllinie zeigten ebenfalls keine IL-10-Effekte (nicht dargestellt). Des Weiteren wurde die IL-10-Wirkung auch an der Lungenepithelzelllinie A549 und der Darmepithelzelllinie Caco-2 untersucht, die ebenfalls nach Zytokininduktion LBP exprimieren. Auch hier konnte nach wiederholten Versuchen kein IL-10-Effekt auf die LBP-Expression nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

4.2 Die Wirkung von TGF- β 1 auf die LBP-Proteinkonzentration in Kulturüberständen

Um zu untersuchen, inwieweit sich der TGF- β 1-Hemmeffekt auf die LBP-Proteinsynthese auswirkt, wurden die beiden humanen Hepatomzelllinien mit IL-1, IL-6 und Dex stimuliert, mit TGF- β 1 inkubiert und anschließend die LBP-Konzentration in den Kulturüberständen mit dem hLBP-ELISA bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die LBP-Konzentration in den Kulturüberständen kontinuierlich mit zunehmender TGF- β 1-Konzentration abnimmt. Diese Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit ist unabhängig von der Stärke und Art der Stimulation. Ob die LBP-Produktion mit 500 U/ml IL-6 induziert wurde oder die Zellen maximal mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex stimuliert wurden, TGF- β 1 hemmte die LBP-Freisetzung in gleicher Weise (Abb. 25A).

Die Variation der Kulturdauer ergab auch zu verschiedenen Zeitpunkten eine Verminderung der induzierten LBP-Expression durch TGF- β 1. Nach 24 bis 72 Stunden Stimulation und TGF- β 1-Inkubation wurde eine zunehmende Hemmung bei steigender TGF- β 1-Konzentration beobachtet. Nach 12 Stunden Stimulation konnte dabei kein Hemmeffekt mehr gezeigt werden (Abb. 25B). Die Inkubation von TGF- β 1 vier Stunden vor der Zellstimulierung, gleichzeitig oder bis zu drei Stunden nach der Stimulierung führte in jedem Fall zu verminderter LBP-Konzentration in den Kulturüberständen (Abb. 25C).

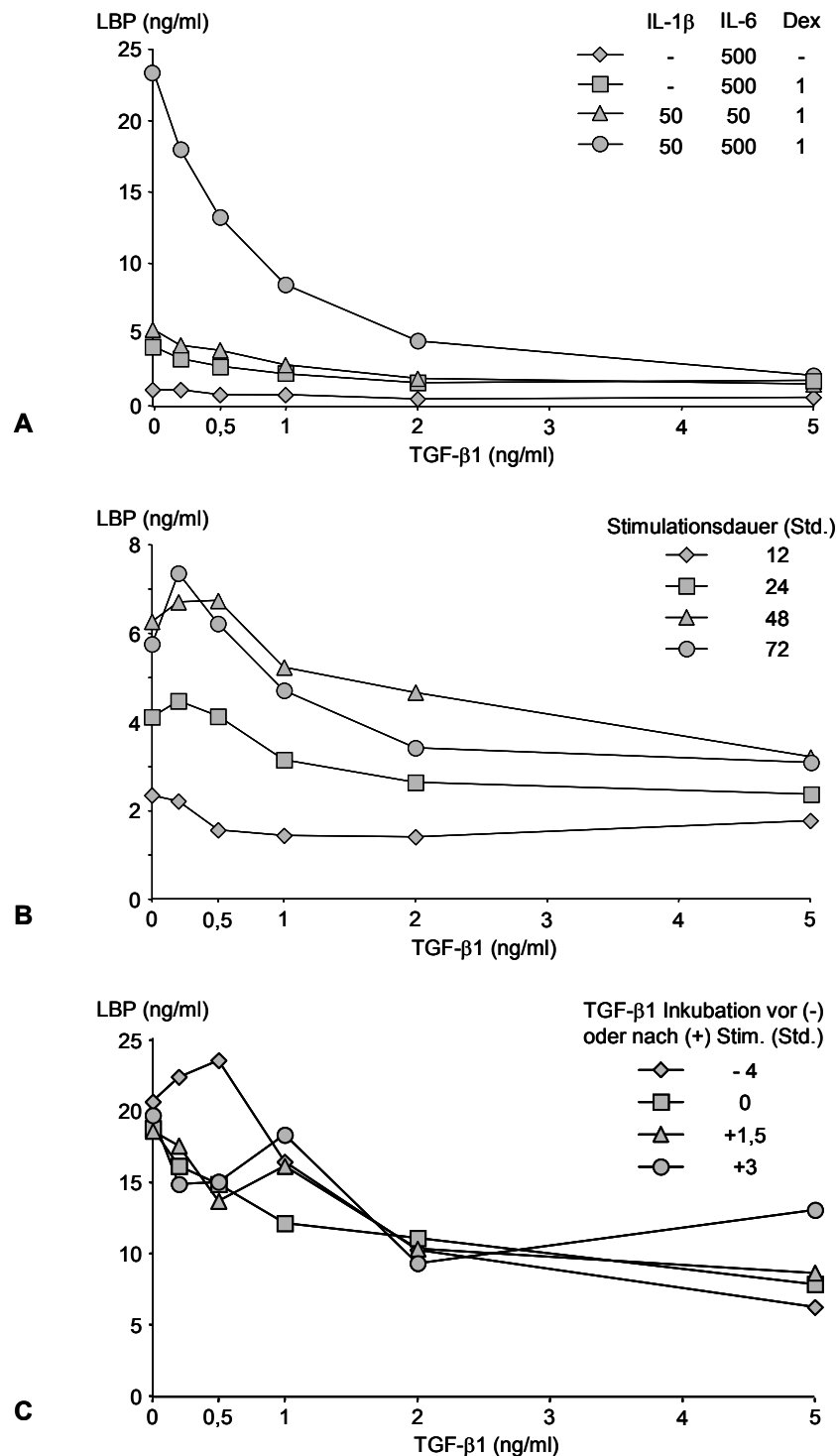


Abb. 25: TGF-β1 hemmt die LBP-Freisetzung aus stimulierten HuH-7 Zellen

A: HuH-7-Zellen wurden mit IL-1, IL-6 und Dex wie angegeben stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen zeitgleich mit 0 bis 5 ng/ml TGF-β1 für 48 Stunden inkubiert. B: HuH-7-Zellen wurden maximal mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μM Dex stimuliert und gleichzeitig mit den verschiedenen TGF-β1-Konzentrationen inkubiert. Die Kulturdauer betrug 12, 24, 48 oder 72 Stunden. C: Die Zellen wurden maximal stimuliert und mit zunehmenden TGF-β1-Konzentrationen für 48 Stunden inkubiert. TGF-β1 wurde entweder 4 Stunden vor, gleichzeitig oder 1,5 bzw. 3 Stunden nach den Stimulanzen in die Zellkultur gegeben. Nach Abschluss der Stimulationsreihen wurde in den Zellkulturüberständen mit einem hLBP-ELISA die LBP-Konzentration gemessen.

4.3 LBP-Promotoraktivität in stimulierten Hepatomzellen nach TGF- β 1-Inkubation

Im Folgenden wurde untersucht, ob der TGF- β 1-Hemmeffekt transkriptionell vermittelt wird. Dazu wurden die im vorigen Abschnitt beschriebenen Stimulationsexperimente mit Zellen, in die vorher das LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt transfiziert wurde, in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von TGF- β 1 wiederholt und die Promotoraktivität gemessen.

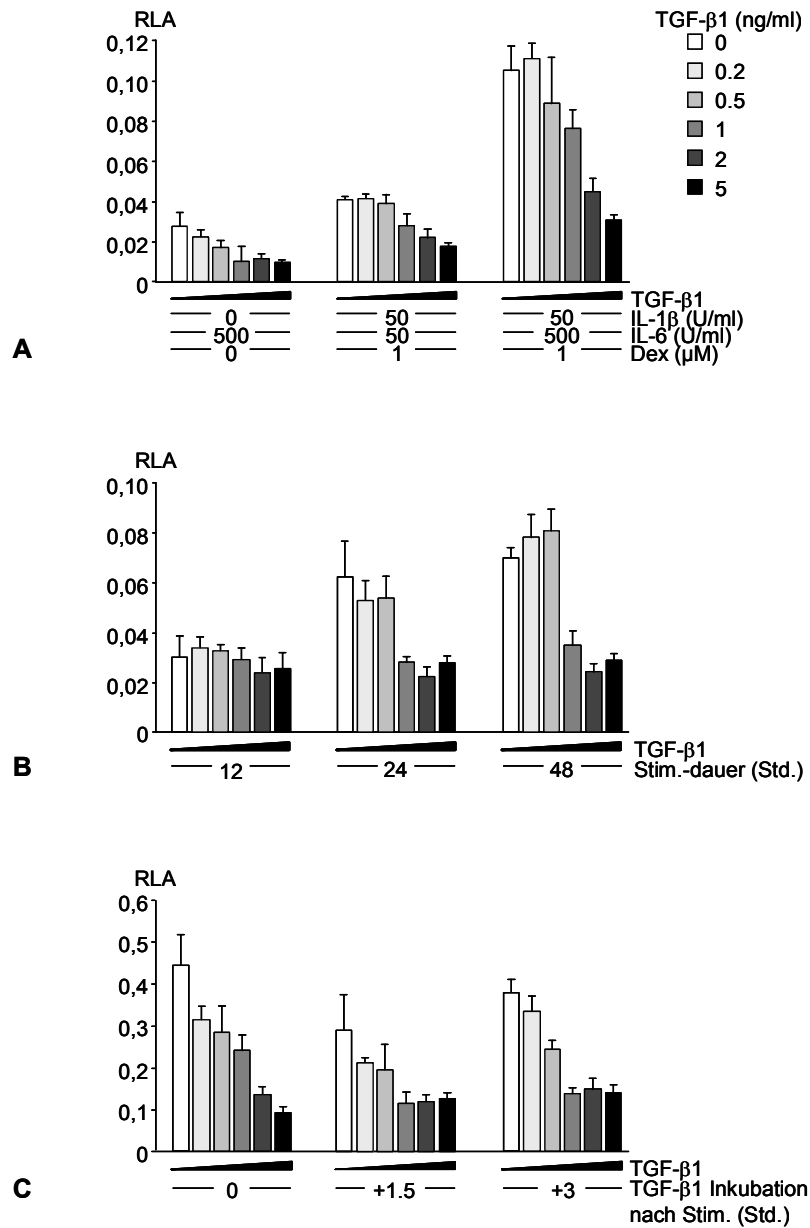


Abb. 26: TGF- β 1 hemmt die LBP-Promotoraktivität in stimulierten HuH-7-Zellen

HuH-7 Zellen wurden mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt transfiziert und mit IL-1, IL-6 und Dex stimuliert. Zusätzlich wurden mit verschiedenen Konzentrationen von TGF- β 1 inkubiert. A: TGF- β 1 wurde mit den Stimulanzen zusammen verabreicht und für 48 Stunden kultiviert. Die Stimulation wurde variiert wie angegeben. B: Maximale Stimulation mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex und gleichzeitig Inkubation von TGF- β 1. Variiert wurde die Kulturdauer wie angegeben. C: Die Zellen wurden maximal für 48 Stunden stimuliert und TGF- β 1 wie angegeben gleichzeitig, oder nach den Stimulanzen verabreicht. Nach Abschluss der Stimulation wurde die Luciferaseaktivität gemessen und β -Gal-normalisiert (relative Luciferaseaktivität, RLA)

Im Wesentlichen entspricht die durch TGF- β 1 induzierte Hemmung der LBP-Promotoraktivität (Abb. 25) dem Muster der Hemmung bei der LBP-Proteinsynthese (Abb. 26). Insgesamt aber war die Hemmung der Promotoraktivität durch TGF- β 1 geringer als auf Proteinebene, was evtl. ein Hinweis auf zusätzlich wirksame posttranskriptionelle Prozesse ist.

5 Smad- und AP-1-Bindungsstellen bei der Vermittlung der TGF- β 1-Wirkung

5.1 Smad-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor

Typischerweise werden TGF- β 1-Effekte durch die so genannten Smad-TF vermittelt. Sie umfassen eine Gruppe von Proteinen, die sowohl für die Signaltransduktion zuständig sind als auch als TF fungieren. In der Literatur sind verschiedene Smad-Konsensussequenzen beschrieben. Bei der Suche nach solchen potentiellen Smad-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor wurden mehrere gefunden. In Tabelle 7 sind fünf untersuchte, potentielle Smad-Bindungsstellen mit ihren Konsensussequenzen aufgeführt. Weitere 6 Smad-Konsensussequenzen mit der Basenfolge AGAC, die sich ebenfalls auf dem Promotor befinden, wurden nicht analysiert.

Tab. 7: Smad-Konsensussequenzen und potentielle Bindungsstellen

Konsensussequenz	Position / (Orientierung)	Analyseart / Aktivität	Referenz
GTCTAGAC*	– 1407 / (-)	EMSA / -	[189]
AGAC**	– 918 / (-)	EMSA / -	[190]
AGAC**	– 925 / (+)	EMSA / -	
CAGAC	– 303 / (-)	Mutation / -	[191, 192]
CAGAC	– 1294 / (-)	EMSA / + Mutation / +	

* Auf dem LBP-Promotor befindet sich die Kernregion (TCTAGA) der Konsensussequenz

** Die zwei untersuchten AGAC-Bindungsstellen von insgesamt acht auf dem LBP-Promotor

Insgesamt befinden sich 11 AGAC-Elemente auf dem LBP-Promotor. Bei einer zufälligen Verteilung der 4-basigen Sequenz würde im Mittel alle 256 Basen eines dieser Element auftreten, d.h. auf dem gesamten Promotor wären etwa 6 - 7 dieser Elemente zu erwarten. Dieses Smad-Bindungsmotiv ist also überdurchschnittlich häufig auf dem LBP-Promotor vertreten. Die fünf untersuchten Elemente wurden mit Hilfe der EMSA-Technik und/oder durch Mutagenese-Experimente analysiert. Die Ergebnisse der drei Bindungsstellen ohne positiven Befund sind hier nicht abgebildet.

Um die unerwartete Wirkung einer Smad-Bindungsstelle auf den LBP-Promotor nach TGF- β 1-Inkubation besser zu verstehen hier zunächst die Darstellung eines bislang noch nicht gezeigten TGF- β 1-Experiments: Wurden die Zellen mit TGF- β 1 allein und nicht mit IL-1, IL-6 und Dex inkubiert, zeigte sich eine signifikante und regelmäßig auftretende Induktion des LBP-Promotors die etwa 2- bis 4-fach über der konstitutiven Promotoraktivität lag (Abb. 27). TGF- β 1 hat demnach

neben seiner hemmenden Hauptwirkung auch einen stimulatorischen Effekt auf den LBP-Promotor, wenn es allein verabreicht wird.

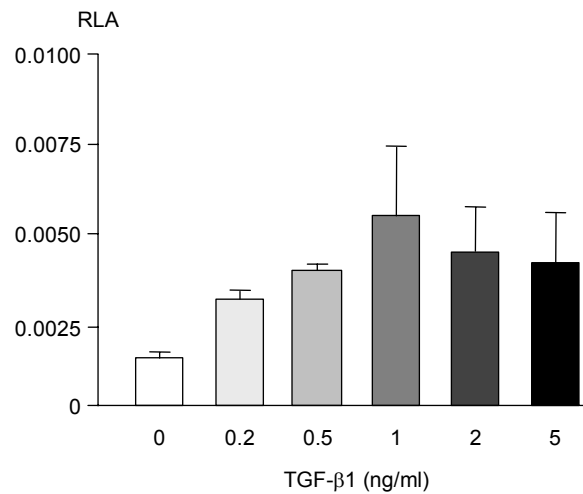


Abb. 27: TGF-β1 verstärkt die LBP-Promotoraktivität in unstimulierten Zellen

HuH-7 Zellen wurden mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt transfiziert und anschließend mit TGF-β1 in Konzentrationen von 0 bis 5 ng/ml für 48 Stunden inkubiert (keine Stimulation mit Zytokinen und Dex). Anschließend wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Dargestellt ist die β-Gal-normalisierte relative Luciferaseaktivität (RLA).

Nun wurden die beiden potentiellen Smad-Bindungsstellen Smad I und II wie in Abb. 28 dargestellt im LBP-Promotor mutiert. Unabhängig davon, ob mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μM Dex maximal oder nur mit 500 U/ml IL-6 stimuliert wurde, konnte keine Änderung des TGF-β1-Hemmeffekts in mutierten Promotoren beobachtet werden (linker und mittlerer Dreierblock). Wurden die Zellen nur mit TGF-β1 inkubiert, zeigte sich im wt-Promotor die beschriebene stimulierende Wirkung von TGF-β1. Nach Mutation der Smad II-Bindungsstelle konnte diese stimulierende Wirkung durch TGF-β1 nicht mehr beobachtet werden. Nach Mutation der Smad I-Stelle ergab sich keine signifikante Abnahme der TGF-β1-Wirkung im Vergleich zum wt-Promotor (rechter Dreierblock).

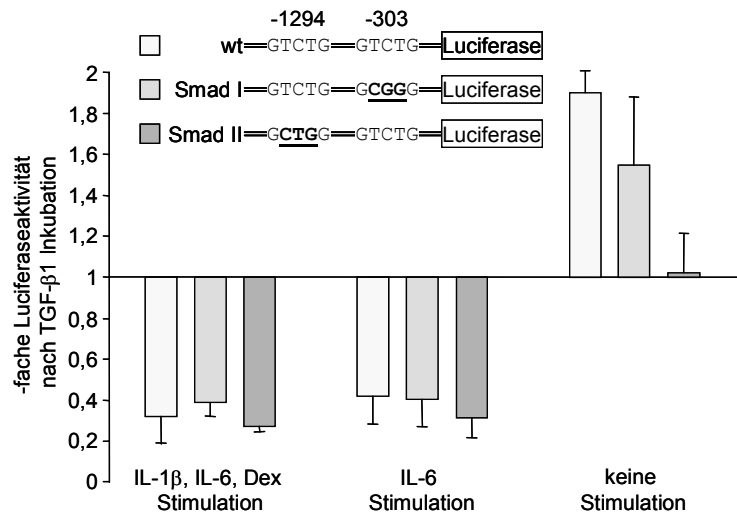


Abb. 28: Eine Smad-Bindungsstelle vermittelt die aktivierende Wirkung von TGF-β1

Smad I (-303 bp) und Smad II (-1294 bp) wurden wie dargestellt auf dem LBP-Promotor mutiert und das Promotor/Luciferase-Konstrukt in HepG2-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit 500 U/ml IL-6 oder mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μM Dex stimuliert und gleichzeitig mit und ohne 5 ng/ml TGF-β1 für 48 Stunden inkubiert. Dargestellt ist die Promotoraktivität nach TGF-β1-Inkubation im Verhältnis zur Aktivität ohne TGF-β1-Inkubation.

Die EMSA-Analyse der Smad II-Bindungsstelle ergab ebenfalls spezifische Effekte nach Inkubation mit TGF-β1. Wurden HepG2-Zellen mit TGF-β1 allein für die Dauer von 0 bis zu 12 Stunden inkubiert, konnte eine über den Zeitverlauf zunehmende Proteinbindung an Smad II gezeigt werden (Abb. 29).

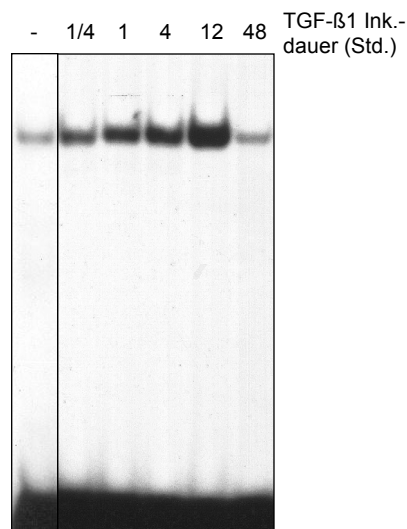


Abb. 29: Spezifische TGF-β1-Effekte an der Smad II-Bindungsstelle (-1294 bp)

HuH-7-Zellen wurden mit 5 ng/ml TGF-β1 15 min bis 48 Stunden inkubiert. Nach der Zellyse wurden die nukleären Proteine isoliert und zusammen mit einem ^{32}P -markierten Oligonukleotid, das die Basensequenz des LBP-Promotors an der potentiellen TF-Bindungsstelle Smad II bei -1294 bp repräsentiert, inkubiert, und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach 48 Stunden war die Proteinbindung wieder auf dem Niveau unbehandelter Zellen. Mit Konkurrenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Proteinbindung spezifisch an die Smad-Sequenz erfolgt (nicht dargestellt).

5.2 Lokalisation der TGF- β 1-Hemmeffekte auf dem LBP-Promotor

Nachdem die Vermittlung der TGF- β 1-Hemmeffekte nicht auf Smad-Bindungsstellen oder Smad-ähnliche Elemente zurückgeführt werden konnte, wurde der LBP-Promotor mit Hilfe trunkierter Promotorelemente weiter untersucht (Abb. 30). Es wurden acht Trunkationen verwendet, die den LBP-Promotor bis etwa -1000 bp abdecken. Die Hepatomzellen wurden mit den Luciferasekonstrukten transfiziert und anschließend mit IL-6 oder IL-1, IL-6 und Dex stimuliert und +/- TGF- β 1 für 48 Stunden inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulierbarkeit des Promotors ab der Trunkation Nr.6 deutlich zunimmt, gleichzeitig ist ab diesem Element der TGF- β 1-Hemmeffekt zu beobachten, der in kürzeren Promotorfragmenten nicht auftritt (Abb. 30A). In Abb. 30B sind die TGF- β 1-Effekte, die nach Stimulation auftreten, im Verhältnis zur Promotoraktivität ohne TGF- β 1-Inkubation aufgetragen. In den kurzen Promotorfragmenten bis Nr. 5 vermittelt TGF- β 1 eine stimulierende Wirkung auf den Promotor, die zu einer Steigerung der Aktivität um bis zu 70 % führt. Dieser Effekt ist - im Gegensatz zu dem weiter oben beschriebenen stimulierenden TGF- β 1-Effekt im ganzen Promotor - unabhängig von einer eventuellen Stimulierung der Zellen.

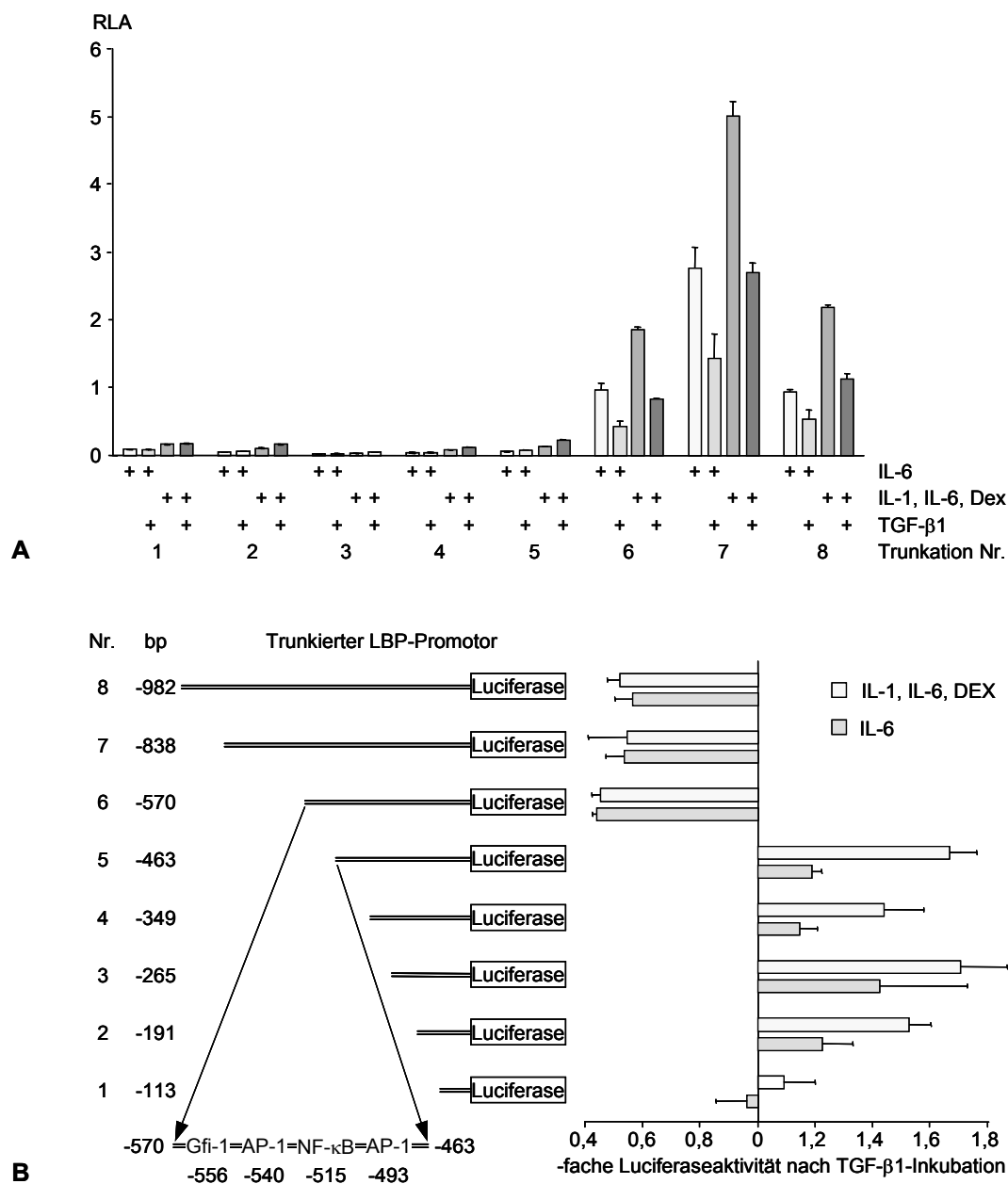


Abb. 30: Die inhibierende TGF- β 1-Wirkung wird von einem kleinen Promotorbereich vermittelt

HepG2-Zellen wurden mit den trunkierten LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukten Nr. 1-8 transfiziert. Sie enthalten mit zunehmender Länge Teile des LBP-Promotors. Anschließend wurden die Zellen mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex oder nur mit 500 U/ml IL-6 stimuliert und mit oder ohne 5 ng/ml TGF- β 1 für 48 kultiviert. A: Darstellung der relativen Luciferaseaktivität (RLA). B: Verhältnis von Promotoraktivität nach Inkubation von TGF- β 1 zu Aktivität ohne TGF- β 1-Inkubation. Skizzierte Darstellung der Trunkationen und potentieller TF-Bindungsstellen im Bereich -463 bis -570 bp.

Deutlich ist der Umschwung von stimulierender zu hemmender TGF- β 1-Wirkung zu erkennen. Die Vermittlung des hemmenden TGF- β 1-Effekts muss demnach über ein Promotorelement erfolgen, das im Bereich zwischen -570 und -493 bp vor dem Transkriptionsstart lokalisiert ist. In diesem Bereich befinden sich mehrere potentielle TF-Bindungsstellen, die annähernd ideal mit ihren

Konsensussequenzen übereinstimmen (Abb. 31): Zwei aktive AP-1-Bindungsstellen, eine bei -493 bp (siehe Abb. 11) und eine zweite bei -540 bp, deren Aktivität in der Arbeitsgruppe schon nachgewiesen werden konnte [73]; eine aktive NF- κ B-Bindungsstelle (siehe Abb. 17) und ein noch nicht untersuchtes Gfi-1-Element.

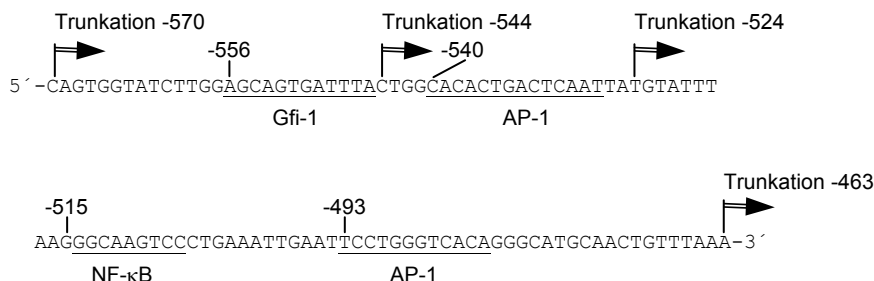


Abb. 31: TF-Bindungsstellen und Trunkationen zwischen -463 und -570 bp

Auf dem LBP-Promotor befinden sich im Bereich zwischen -463 bp und -570 bp eine aktive NF- κ B-Bindungsstelle und zwei aktive AP-1-Bindungsstellen, weiterhin eine potentielle, noch nicht untersuchte Gfi-1 Bindungsstelle mit sehr hoher Übereinstimmung zur Konsensussequenz. Trunkierte Promotorelemente wurden wie dargestellt verwendet.

Um den Bereich, der die TGF- β 1-Hemmeffekte vermittelt, weiter eingrenzen zu können, wurden feiner abgestufte Trunkationen des LBP-Promotors entworfen, kloniert und verwendet (Abb. 31): Die Ergebnisse dieser Trunkationen zeigen, dass offensichtlich nicht eine Bindungsstelle allein für die Vermittlung der TGF- β 1-Effekte verantwortlich ist (Abb. 32). Die hauptsächliche Vermittlung des TGF- β 1-Hemmeffekts erfolgt im Bereich des Promotors zwischen -570 bp und -544 bp, in dem sich die Gfi-1-Bindungsstelle befindet.

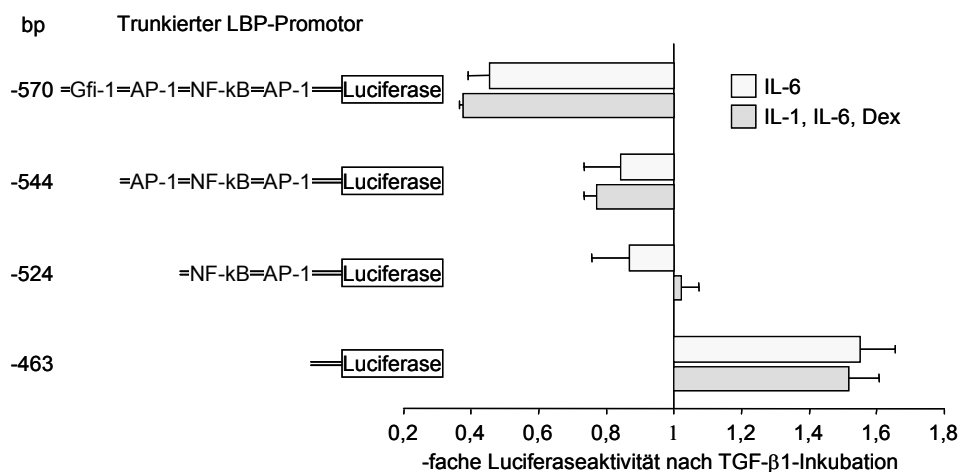


Abb. 32: TGF- β 1-Effekte auf dem LBP-Promotor zwischen -570 und -463 bp

HepG2-Zellen wurden mit den abgebildeten Trunkationen des LBP-Promotors/Luciferase-Konstruktes transfiziert, 48 Stunden mit 500 U/ml IL-6 oder 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex stimuliert und mit +/- 5 ng/ml TGF- β 1 inkubiert. Dargestellt ist die x-fache Promotoraktivität nach TGF- β 1-Inkubation im Verhältnis zur Promotoraktivität ohne TGF- β 1-Inkubation.

Der TGF- β 1-Hemmeffekt reduziert sich hier um etwa 2/3. Die sich anschließende AP-1-Bindungsstelle könnte evtl. ebenfalls einen Teil des Hemmeffekts vermitteln, da bei Ausschluss

dieser Sequenz die TGF- β 1-Hemmung noch einmal deutlich abgefallen war. Die NF- κ B- und die zweite AP-1-Bindungsstelle scheinen hingegen nach diesem Experiment keine hemmende TGF- β 1-Wirkung zu vermitteln.

5.3 Mediation des TGF- β 1-Hemmeffekts durch die AP-1-Bindungsstelle –540 bp

AP-1 ist kürzlich als Transkriptionsfaktor beschrieben worden, der unter anderem auch in die Vermittlung von TGF- β 1-Effekten involviert ist. Daher wurde zunächst die AP-1-Site bei –540 durch Deletion der Bindungsstelle untersucht. Diese in Abb. 33 abgebildete Mutation wurde sowohl in den vollständigen Promotor (–1780 bp) als auch in eine Trunkation mit –570 bp Länge integriert. Die Untersuchung der Mutationen mit Hilfe des Luciferase-Reportergen-Assays bestätigt, dass die AP-1 Site (–540 bp) an der Vermittlung des TGF- β 1 Hemmeffekts beteiligt ist. Vor allem in dem trunkierten LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt ist nach Mutation dieser Sequenz der TGF- β 1-Hemmeffekt mit über 50 % deutlich herabgesetzt.

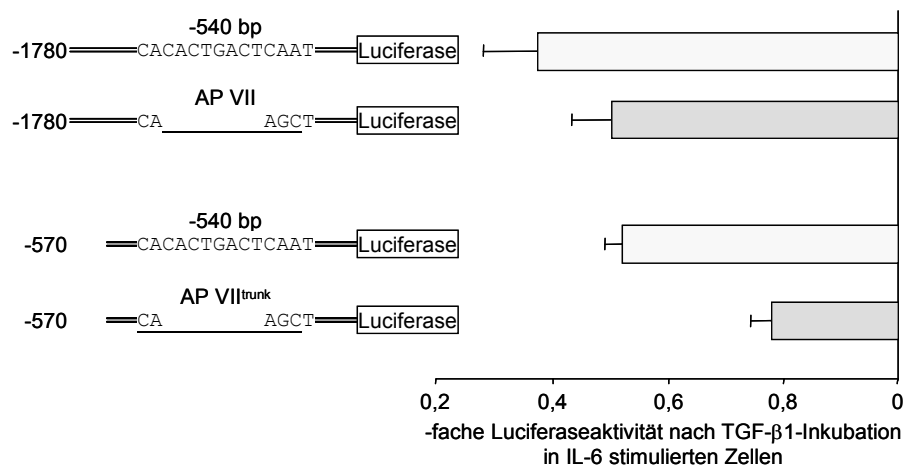


Abb. 33: Die Bindungsstelle AP VII ist in die Vermittlung des TGF- β 1-Hemmeffekts involviert

Die AP-1-Bindungsstelle (–540 bp) wurde in der angegebenen Weise durch Deletion einiger Basenpaare sowohl auf dem vollständigen LBP-Promotor (–1780 bp) als auch auf dem trunkierten Promotorfragment 570 bp mutiert und in HepG2 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit 500 U/ml IL-6 und +/- 5 ng/ml TGF- β 1 inkubiert. Dargestellt ist die Promotoraktivität mit TGF- β 1-Inkubation im Verhältnis zur Promotoraktivität ohne TGF- β 1.

Die Beteiligung dieser AP-1-Bindungsstelle (–540 bp) an der Vermittlung der TGF- β 1-Effekte konnte des Weiteren durch Gelshift-Analysen bestätigt werden. Nach Inkubation mit TGF- β 1 von 0,5 bis 48 Stunden in HuH-7-Zellen konnte eine mit der Inkubationsdauer zunehmende Proteinbindung an ein Oligonukleotid, das die AP-1-Bindungsstelle repräsentiert, beobachtet werden (Abb. 34).

Nach Stimulation der Zellen mit IL-1, IL-6 und Dex für 4 Stunden wurde ebenfalls eine erhöhte Proteinbindung im Vergleich zu unstimulierten Zellen detektiert. Wurden die Zellen noch zusätzlich mit TGF- β 1 behandelt, führte das zu einer weiteren sehr starken Proteinbindung. Wurden die Zellen für 24 Stunden stimuliert, so zeigte sich auch ohne TGF- β 1 eine starke Proteinbindung, die sich dann aber nach zusätzlicher TGF- β 1-Inkubation wieder abschwächte. Mit Hilfe von

Kompetitionsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinbindung spezifisch für die AP-1-Bindungsstelle ist (nicht dargestellt).

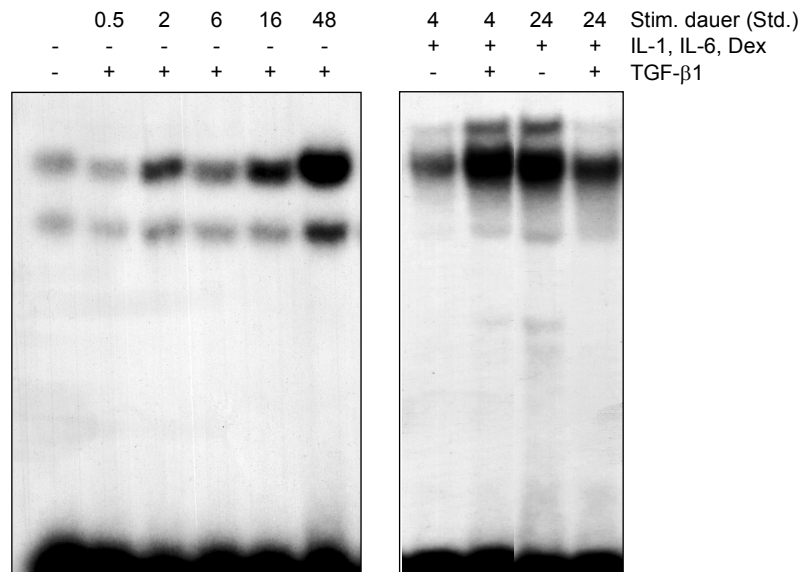


Abb. 34: TGF- β 1-Inkubation führt zu spezifischen Effekten an der AP-1-Bindungsstelle AP VII

HuH-7-Zellen wurden mit TGF- β 1 (5 ng/ml), IL-1 (50 U/ml), IL-6 (500 U/ml) und Dex (1 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die nukleären Proteine isoliert und mit einem Oligonukleotid inkubiert, das die Sequenz des LBP-Promotors an der AP-1 Bindungsstelle bei -537 bp repräsentiert. Linke Teilabbildung: Die Zellen wurden nur mit TGF- β 1 für 30 min bis 48 Stunden inkubiert. Rechts: Die Zellen wurden mit IL-1, IL-6 und Dex +/- TGF- β 1 für 4 oder 24 Stunden inkubiert.

6 Die Funktion von Gfi-1 bei der Vermittlung des TGF- β 1-Hemmeffektes

6.1 Analyse der Gfi-1-Bindungsstelle bei -556 bp

Als nächstes wurde die Bedeutung der Gfi-1-Bindungsstelle (-556 bp) durch Mutagenese und Reporteragen-Assay untersucht. Sie wurde dazu zweimal mutiert, erstens durch den Austausch zweier Basen (Gfi Ia) und zweitens durch Deletion der Bindungsstelle (Gfi Ib), wie in Abb. 35A dargestellt. Beide Mutationen wurden sowohl in den vollständigen Promotor als auch in die 570 bp lange Trunkation (Gfi Ia^{trunk} und Gfi Ib^{trunk}) integriert.

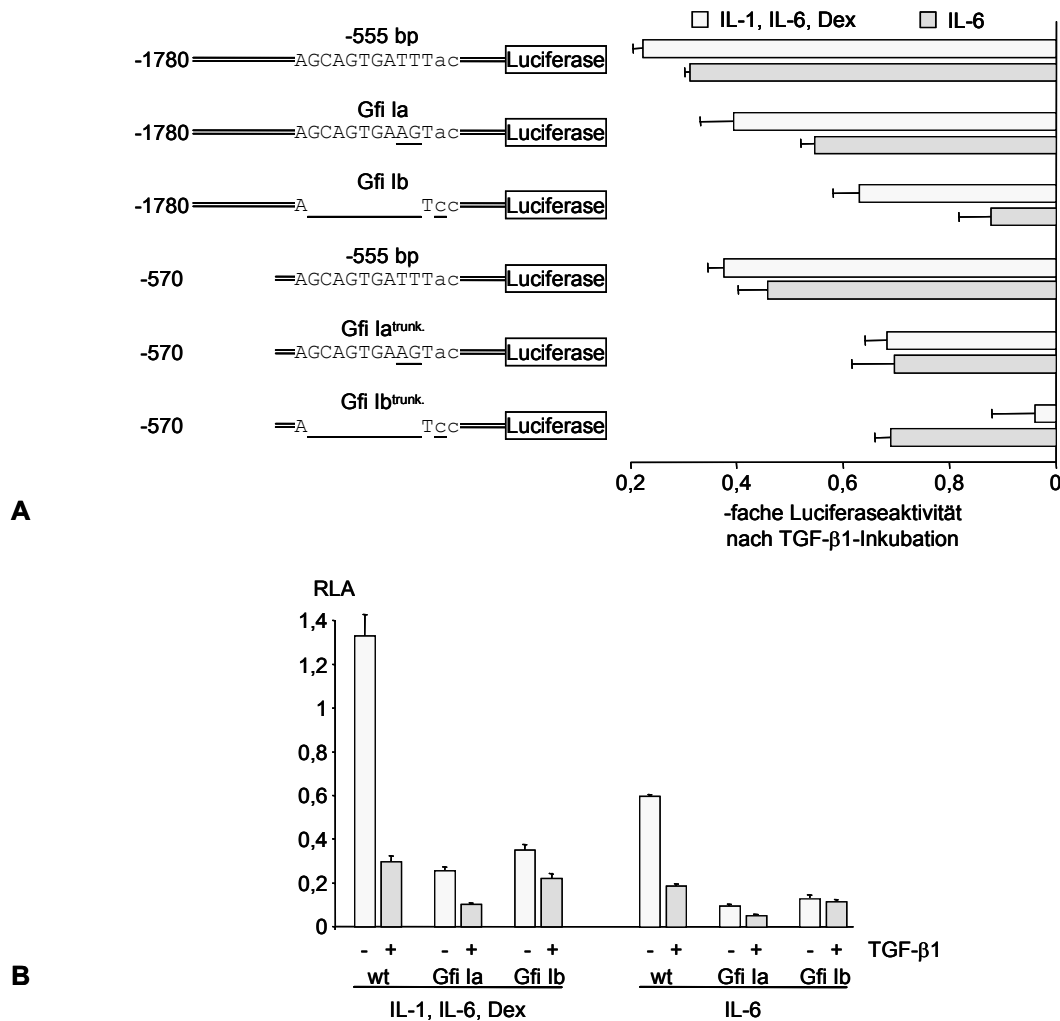


Abb. 35: Mutation der Gfi-1-Bindungsstelle und die Wirkung auf den TGF- β 1-Hemmeffekt

Die Gfi-1-Bindungsstelle wurde insgesamt 4x mutiert: Erstens durch den Austausch zweier Basen (Gfi Ia) und zweitens durch die Deletion von 9 Basen (Gfi Ib). Beide Mutationen wurden sowohl am vollständigen Promotor mit 1780 bp als auch am trunkierten Promotor mit 570 bp (^{trunk}) durchgeführt. Die mit den Konstrukten transfizierten HepG2-Zellen wurden für 48 Stunden stimuliert und mit/ohne TGF- β 1 inkubiert. A: Stimulierung mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6, 1 μ M Dex B oder mit 500 U/ml IL-6. Dargestellt ist der relative TGF- β 1-Hemmeffekt nach Stimulation (+TGF- β 1/-TGF- β 1). In Abb. 35B sind die Mutationsexperimente mit dem vollständigen Promotor (1780 bp) aus Abb. 35A als β -Gal-normalisierte Luciferaseaktivität (relative Luciferaseaktivität, RLA) dargestellt.

Der Basentausch (Gfi Ia) führte beim vollständigen Promotor zu einer signifikanten Reduktion des TGF- β 1-Hemmeffekts, die im trunkierten Promotor noch deutlicher zu beobachten war (Gfi Ia^{trunk}). Dies war sowohl nach IL-6 Stimulierung als auch nach maximaler Stimulation mit IL-1, IL-6 und Dex zu beobachten. Wurde die Gfi-1-Bindungsstelle durch Deletion vollständig zerstört, so reduzierte sich der Hemmeffekt noch deutlicher. Im Promotor mit der Mutation Gfi Ib^{trunk} konnte nach maximaler Stimulierung kaum noch ein TGF- β 1-Hemmeffekt beobachtet werden. (Abb. 35A). Die reduzierte Hemmbarkeit des Gfi-1 mutierten Promotors durch TGF- β 1 ging einher mit einer dramatisch reduzierten Induzierbarkeit des Promotors nach Stimulation. Beide Gfi-1-Mutationen, Gfi Ia und Gfi Ib, reduzierten die Aktivierbarkeit des Promotors um etwa 80 % gegenüber dem wt. Dies war sowohl nach maximaler Stimulierung mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex als auch nach moderater Stimulierung mit 500 U/ml IL-6 der Fall (Abb. 35B).

Die Wirkung der TGF- β 1-Inkubation auf die Gfi-1-Bindungsstelle wurde ebenfalls mit der EMSA-Technik untersucht. Dabei konnte eine komplexe Wechselwirkung zwischen Stimulation und Hemmung beobachtet werden. Nach kurzer Stimulationsdauer von bis zu zwei Stunden wirkte das zusätzlich zu den Stimulanzien inkubierte TGF- β 1 verstärkend auf die Proteinbindung an die Gfi-1-Bindungsstelle (Abb. 36A). In einem Zeitfenster von 4 bis 8 Stunden wurde bei zusätzlicher TGF- β 1-Inkubation die Proteinbindung gehemmt. Nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden führte die zusätzliche TGF- β 1-Inkubation zu keiner Veränderung in der Proteinwirkung. Nach Zellstimulation ohne TGF- β 1-Inkubation, zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Proteinbindung, die nach 8 Stunden ihr Maximum erreicht hatte und dann wieder leicht abgefallen war.

Zum Nachweis der spezifischen Proteinbindung wurden die Zellen zusammen mit 5ng/ml TGF- β 1 maximal stimuliert. Die anschließende Inkubation der isolierten nukleären Proteine mit spezifischen bzw. unspezifischen Oligonukleotiden zeigte klar eine sequenzspezifische Bindung des nukleären Proteins (Abb. 36B).

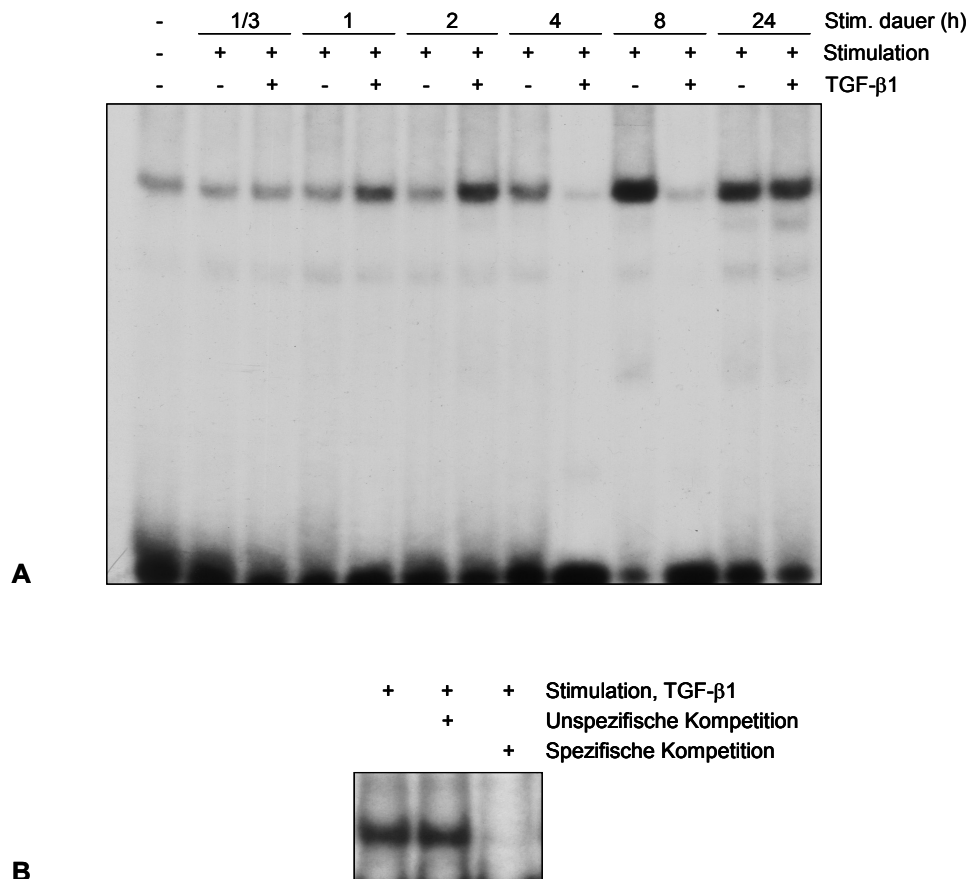


Abb. 36: Spezifische Bindung nukleärer Proteine an die Gfi-1-Bindungsstelle -556 bp

A: HuH-7 Zellen wurden maximal mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex über die angegebenen Zeitspannen stimuliert und gleichzeitig mit 5 ng/ml TGF- β 1 inkubiert. Die isolierten nukleären Extrakte wurden mit einem Oligonukleotid inkubiert, das die Sequenz der Gfi-1 Bindungsstelle vom LBP-Promotor bei -556 bp trägt. B: TGF- β 1 -Inkubation (2 ng/ml) und maximale Stimulation erfolgten für 4 Stunden. B: Die Zellen wurden für 15 Stunden mit 5 ng/ml TGF- β 1 inkubiert und für den gleichen Zeitraum maximal stimuliert. Die Konkurrenz erfolgte mit einem unspezifischen bzw. dem spezifischen Oligonukleotid ohne 32 P-Markierung im 40-fachen Überschuss.

6.2 Die Wechselwirkung der Gfi-1-, AP-1- und NF- κ B-Bindungsstellen

Weitere Mutationsexperimente sollten zeigen, inwieweit die AP-1-(-540 bp) und die Gfi-1-(-556 bp) Bindungsstellen, die beide in die Vermittlung der TGF- β 1-Hemmeffekte involviert sind, interagieren. Dazu wurden die oben beschriebenen Deletionen von Gfi-1 und AP-1 in einem Promotor kombiniert. Wie aus der Abb. 37 hervorgeht, führt die Mutation der AP-1-Bindungsstellen zur Reduktion der TGF- β 1-Hemmung, die bei der Mutation der Gfi-1-Bindungsstelle noch stärker ausgeprägt ist. Wurden nun beide Bindungsstellen gleichzeitig auf dem Promotor mutiert, so ergab sich keine weitere Reduktion des TGF- β 1-Hemmeffektes verglichen mit der alleinigen Gfi-1-Mutation.

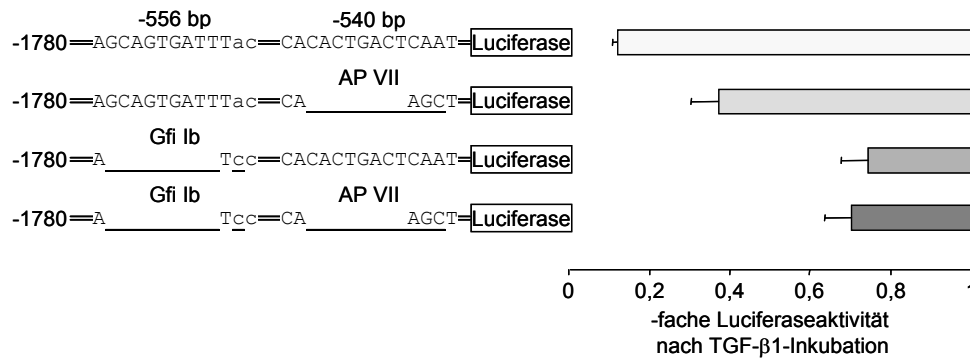


Abb. 37: Die Wechselwirkung von Gfi-1 (-556 bp) und AP-1 (-540 bp)

Die Mutationen Gfi Ib und AP VII wurden einzeln und in Kombination in den LBP-Promotor integriert, HuH-7-Zellen damit transfiziert und die Zellen anschließend für 48 Stunden maximal stimuliert (50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 µM Dex) und mit und ohne 5 ng/ml TGF-β1 behandelt. Dargestellt ist das Verhältnis der Promotoraktivität mit TGF-β1-Inkubation zur Aktivität ohne TGF-β1-Inkubation.

Als nächstes wurden die NF-κB-Bindungsstelle bei -515 bp und die AP-1 Stelle (-493 bp) allein und in Kombination mit Gfi-1 mutiert. Hier wurde der 570 bp lange trunkierte Promotor verwendet, um evtl. vorhandene geringe Effekte deutlicher darstellen zu können (Abb. 38).

Wie in Abschnitt 2.4 gezeigt ist die NF-κB-Stelle bei -515 bp aktiv und trägt zur Stimulierbarkeit des LBP-Promotors bei. Die Mutation der NF-κB-Bindungsstelle führt aber zu keiner reproduzierbaren, signifikanten Änderung der TGF-β1-Wirkung auf den Promotor. Entsprechend ist die Reduktion des Hemmeffekts im Promotor mit der Gfi-1- und NF-κB-Mutation auf demselben Niveau wie nach alleiniger Gfi-1-Mutation. Die AP-1-Bindungsstelle (-493 bp) hat einen geringen, aber klaren Einfluss auf die Hemmwirkung von TGF-β1; sowohl die alleinige Mutation als auch die Kombination mit der mutierten Gfi-1-Bindungsstelle reduzierte den Hemmeffekt von TGF-β1.

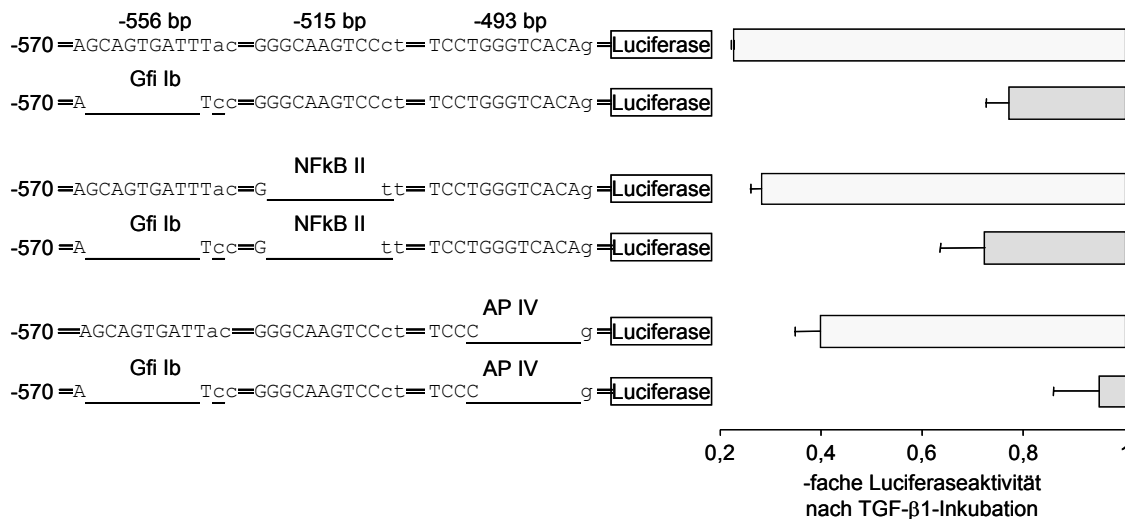


Abb. 38: Der Einfluss der NFκB II- und der AP IV- Bindungsstelle auf den TGF-β1-Hemmeffekt

Die NF-κB Bindungsstelle an Position –515 bp und die AP-1-Bindungsstelle bei –493 bp wurden in der dargestellten Form im trunkierten –570 bp langen Promotor mutiert. Zusätzlich wurden diese Mutationen mit der Mutation Gfi Ib an der Gfi-1-Bindungsstelle bei –556 bp kombiniert. Die transfizierten Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6, 1 μM Dex und mit oder ohne TGF-β1 für 48 Stunden inkubiert. Dargestellt ist der Quotient aus Luciferaseaktivität nach TGF-β1-Inkubation und Luciferaseaktivität ohne TGFβ1-Inkubation.

6.3 Der Einfluss weiterer Gfi-1-Bindungsstellen auf den LBP-Promotor

Auf dem LBP-Promotor befinden sich noch weitere DNA-Sequenzen, die eine hohe Übereinstimmung mit der Gfi-1-Konsensussequenz aufweisen. Drei dieser Sequenzen wurden durch Einfügung von Punktmutationen untersucht.

Zunächst wurde analysiert, wie sich die Gfi-1-Elemente auf die Aktivierbarkeit des Promotors auswirken. Die mutierten LBP-Promotoren und die korrespondierenden wt-Konstrukte wurden in HuH-7-Zellen transfiziert und anschließend maximal stimuliert. Bei zwei Mutationen (Gfi II bei –1167 bp und Gfi III bei –805 bp) hatte die Promotoraktivität gegenüber den wt-Promotoren gering, aber signifikant zugenommen. Bei der dritten Mutante (+60 bp) konnte kein Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Promotors festgestellt werden (nicht dargestellt).

Nach Transfektion, Stimulation und TGF-β1-Inkubation von HuH-7-Zellen konnte gezeigt werden, dass die drei mutierten Gfi-1-Bindungsstellen keinen signifikanten Einfluss auf die Wirkung von TGF-β1 haben (Abb. 39). Die beiden Elemente bei –1667 bp und –839 bp zeigen keinerlei Effekte auf die TGF-β1-vermittelte Hemmung des Promotors. Die Gfi-IV-Mutation bei +60 bp wurde in eine nur 133 bp lange Trunkation eingefügt. Die kurzen Fragmente führen, wie schon in Abschnitt 5.2 gezeigt, zu einer Aktivierung des Promotors durch TGF-β1, unabhängig davon ob die Zellen zusätzlich stimuliert wurden oder nicht. In wiederholten Versuchen führte das Einfügen der Gfi IV-Mutation zu einer Verringerung dieses Effektes. Diese Reduktion der Aktivität war aber nicht konsistent signifikant (wie auch in Abb. 39 gezeigt), so dass eine Aktivität dieser potentiellen Gfi-1-Bindungsstelle in Frage steht.

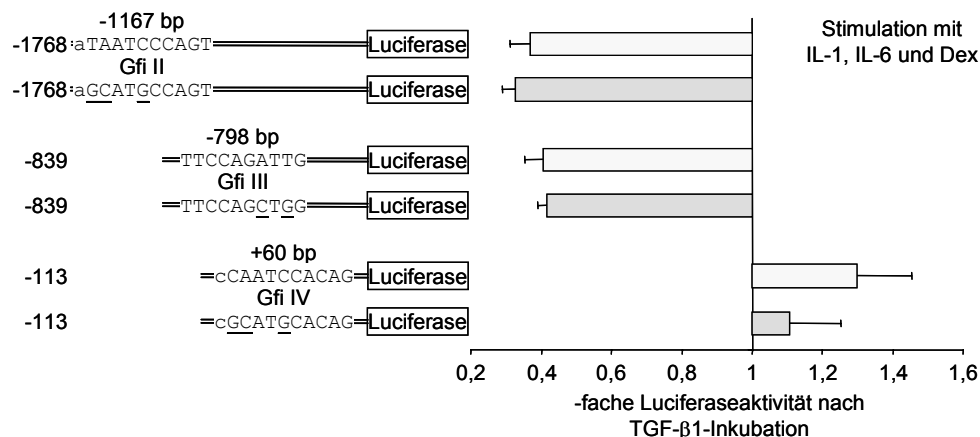


Abb. 39: Der Wirkung der Gfi-1-Bindungsstellen Gfi II, Gfi III und Gfi IV auf TGF-β1-Effekte

Die LBP-Promotoren mit den wie dargestellt eingefügten Mutationen Gfi II, Gfi III und Gfi IV und entsprechende wt-Kontrollen wurden in HuH-7-Zellen transfiziert und die Zellen anschließend mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 µM Dex für 48 Stunden maximal stimuliert und zusätzlich +/- TGF-β1 inkubiert. Bei der anschließend gemessenen Luciferaseaktivität wurden die Ergebnisse mit TGF-β1-Inkubation durch die Messwerte ohne TGF-β1-Inkubation dividiert.

6.4 Kotransfektion eines pGfi-1-Expressionsvektors in die Hepatomzellen

Um neben den Gfi-1-Bindungsstellen auch die Wirkung des Gfi-1-Proteins untersuchen zu können, wurde ein Gfi-1-Expressionsvektor (pGfi-1) in die Hepatomzelllinien transfiziert, der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Möröy, Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt wurde.

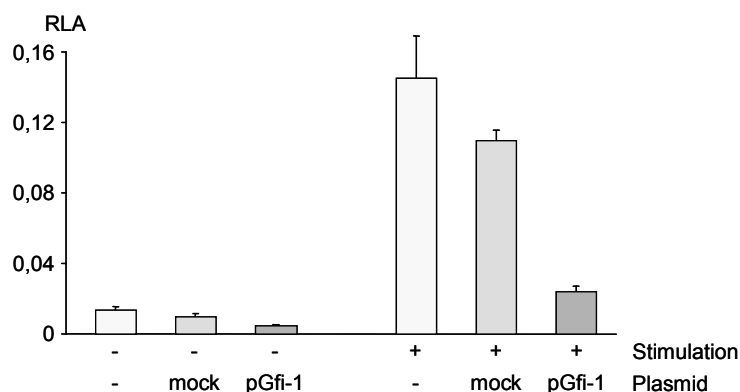


Abb. 40: Die Expression des Gfi-1-Proteins hemmt die LBP-Promotoraktivität

HepG2-Zellen wurden mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt transfiziert und mit 1 µg/Ansatz pGfi-1 Expressionsvektor kotransfiziert. Am Tag danach wurden die Zellen maximal, d.h. mit 50 U/ml IL-, 500 U/ml IL-6 und 1 µM Dex für 48 Stunden stimuliert. (RLA, relative Luciferaseaktivität).

Die Kotransfektion des pGfi-1-Vektors mit dem LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt verursachte dabei eine sehr starke Hemmung des aktivierten LBP-Promotors (Abb. 40).

Der zum Vergleich transfizierte Kontrollvektor mit einer unspezifischen Sequenz führte dagegen nur zu einer relativ geringen Änderung der Promotoraktivität. Selbst in unstimulierten Zellen wurde nach pGfi-1-Kotransfektion die geringe, konstitutive LBP-Expression unterdrückt.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Mutation der Gfi-1-Bindungsstelle bei –556 bp einen Einfluss auf diesen Hemmeffekt hat. Dazu wurden die Promotoren mit den mutierten Gfi-1-Mutationen Gfi Ia^{trunk} und Gfi Ib^{trunk} zusammen mit dem pGfi-1-Vektor kotransfiziert. In Abb. 41 ist der relative Hemmeffekt nach Kotransfektion von pGfi-1 im Verhältnis zum Effekt eines Kontrollplasmids dargestellt. Im trunkierten Promotorelement mit einer Länge von 570 bp beträgt die relative Hemmung in etwa 80 %. Wurde die Promotortrunkation mit der mutierten Gfi Ia^{trunk} –Bindungsstelle bei –556 bp verwendet, so reduzierte sich der Hemmeffekt durch die Kotransfektion auf 50 % (Gfi Ia). Wurde der Promotor mit der vollständig deletierten Gfi-1-Bindungsstelle verwendet (Gfi Ib^{trunk}), reduzierte sich der Hemmeffekt weiter auf 30 %.

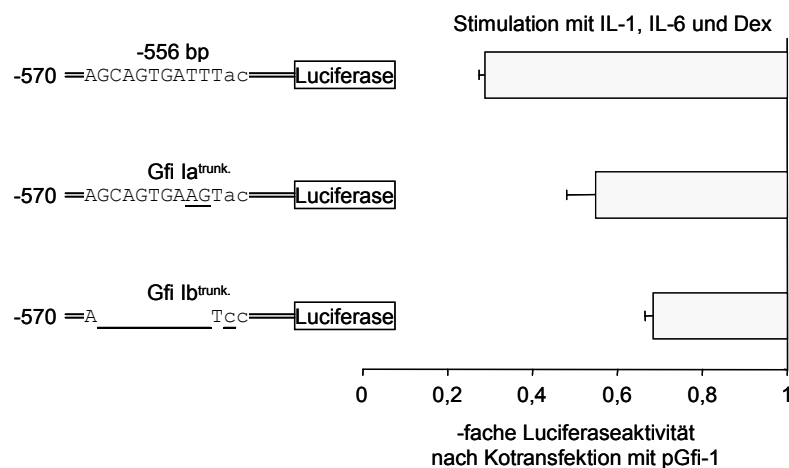


Abb. 41: Die Wirkung des pGfi-1-Vektors auf die Gfi-1-Bindungsstelle bei –556 bp (Gfi I)

HepG2-Zellen wurden mit dem trunkierten LBP-Promotor/Luciferase-Konstrukt –570 bp und den beiden mutierten Promotoren Gfi Ia^{trunk} und Gfi Ib^{trunk} transfiziert und mit dem Expressionsvektor pGfi-1 bzw. einer Kontrolle ohne das Gfi-1-Gen kotransfiziert. Am Tag darauf wurde für 48 Stunden mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 µM Dex stimuliert. Abgetragen ist der relative Hemmeffekt nach pGfi-1-Kotransfektion im Vergleich zum Effekt des Kontrollvektors in den stimulierten Zellen.

Wurden die Promotoren, welche die Gfi-1 Mutanten Gfi II, Gfi III und Gfi IV tragen, mit dem pGfi-1-Expressionsvektor kotransfiziert, konnte kein Effekt nachgewiesen werden. Es bestand zwar ein Trend zu einer Abschwächung des pGfi-1-vermittelten Hemmeffekts, dieser war aber nicht signifikant (nicht dargestellt). Im Übrigen führte die pGfi-1-Kotransfektion mit kurzen LBP-Promotorfragmenten (463 bp Länge oder kürzer) nicht zu einer Aktivierung des Fragments wie sie bei TGF-β1-Inkubation zu beobachten war. Im Trend wurde eher eine Hemmung des aktivierten Promotors beobachtet (nicht dargestellt).

6.5 Die Wirkung der pGfi-1 Mutanten pGfi-1^{Zn+} und pGfi-1^{Zn-} auf den LBP-Promotor

Außer dem wt-Gfi-1-Expressionsvektor wurden uns von Prof. Möröy zwei Mutationen des Gfi-1-Gens zur Verfügung gestellt: Die erste Mutante exprimiert nur die C-terminale DNA-bindende Zinkfingerdomäne von Gfi-1 (pGfi^{Zn}), die zweite Mutation enthält die N-terminale SNAG-Region, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (pGfi^{SNAG}).

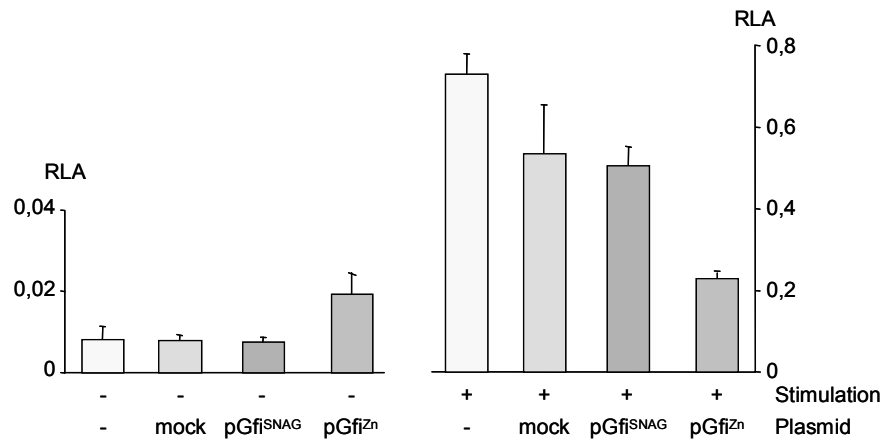


Abb. 42: Die Wirkung von pGfiZn und pGfiSNAG auf den LBP-Promotor

HuH-7 Zellen wurden mit einem pGfi-1-Vektor, der nur die Zinkfingerdomäne trägt (pGfi^{Zn}, DNA-bindende Region), und mit einem Vektor, der nur die SNAG-Region enthält (pGfi^{SNAG}, Protein-Protein-Interaktion), kotransfiziert und für 48 Stunden mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μ M Dex stimuliert. Aufgetragen sind die β -Gal-normalisierten Luciferasemesswerte (RLA, relative Luciferaseaktivität) aus stimulierten und unstimulierten Zellen in unterschiedlicher Skalierung, da die Werte aus den unstimulierten Zellen sehr niedrig waren.

Wurden die Zellen mit pGfi^{SNAG} transfiziert, zeigte sich in stimulierten Zellen, verglichen mit der Transfektionskontrolle, kein Einfluss auf die Aktivierbarkeit des LBP-Promotors. Die Gfi-1-Mutante pGfi^{Zn} übte dagegen einen deutlich hemmenden Einfluss auf die Aktivität des LBP-Promotors aus (Abb. 42 rechte Teilabbildung). In unstimulierten Zellen war ebenfalls keine Wirkung nach pGfi^{SNAG} zu beobachten; wurde mit pGfi^{Zn} kotransfiziert, zeigte sich ein schwacher stimulatorischer Effekt. Bis dato wurden die Ergebnisse der Luciferasemessungen immer mit der Aktivität eines kotransfizierten β -Gal-Plasmids abgeglichen, um eventuelle Schwankungen, die im Zusammenhang mit der Transfektion auftreten, auszugleichen. Es zeigte sich jedoch, dass pGfi^{Zn+} ebenfalls einen starken hemmenden Effekt auf die β -Gal-Aktivität ausübt, so dass sich nach dem β -Gal-Abgleich der pGfi^{Zn+}-Hemmeffekt schwächer darstellte, als er tatsächlich war. Daher wurden alternativ die Luciferasemesswerte gegen die Gesamtproteinkonzentration der lysierten Zellen abgeglichen. Diese früher übliche Methode gleicht Fehler aus, die sich aus unterschiedlichem Zellwachstum ergeben. Nach diesen Ergebnissen ging die Aktivität des maximal stimulierten Promotors bei pGfi^{Zn}-Transfektion um über 90 % zurück, also etwa in der gleichen Stärke wie nach der wt-pGfi-1-Transfektion (nicht dargestellt).

6.6 Gfi-1-Expression in der Hepatomzelllinie HepG2

Da die Expression von Gfi-1 in Leberzellen bzw. in der Hepatomzelllinie HepG2 in der Literatur bislang noch nicht beschrieben wurde, dies aber die Grundvoraussetzung für die Vermittlung von TGF- β 1-Effekten durch Gfi-1 ist, wurde eine Gfi-1-spezifische rtPCR etabliert.

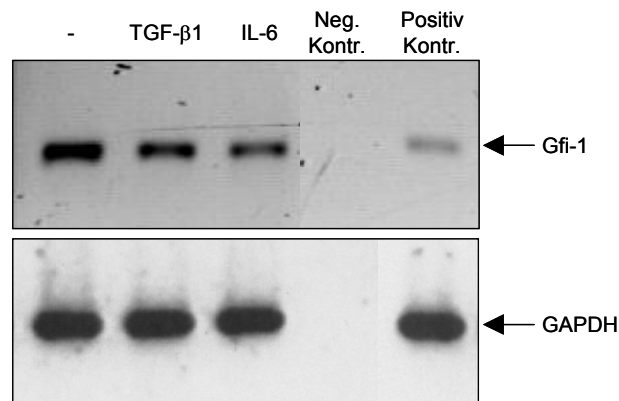


Abb. 43: Gfi-1 mRNA-Akkumulation in HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden mit TGF-β1 (5ng/ml) und IL-6 (500 U/ml) für 4 Stunden inkubiert. Gesamt-RNA wurde isoliert und mit Gfi-1-spezifischen Primern rtPCR durchgeführt. Die Negativkontrolle ist die sogenannte Wasserkontrolle (keine Primer, kein Mastermix). Bei der Positivkontrolle wurden die Zellen mit dem Expressionsvektor pGfi-1 transfiziert. Dem Nachweis der Integrität der RNA und dem internen Abgleich dient GAPDH.

Wie in Abb. 43 gezeigt, konnte sowohl in unstimulierten HepG2-Zellen als auch nach TGF-β1- bzw. IL-6-Inkubation eine starke Gfi-1 mRNA- Transkriptakkumulation nachgewiesen werden. Evtl. führt die Inkubation von TGF-β1 und IL-6 zu einer Reduktion der Gfi-1 mRNA-Akkumulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen, zumindest aber scheint die TGF-β1-Wirkung nicht über die Aufregulation der Gfi-1 mRNA-Konzentration vermittelt zu werden.

6.7 LBP-Serumkonzentrationen in Gfi-1-Knockout-Mäusen

Um zu bestätigen, dass Gfi-1 eine wichtige Rolle in der LBP-Regulation spielt, wurde der LBP-Spiegel im Serum von Gfi1-defizienten Mäusen untersucht, das dankenswerterweise ebenfalls von Prof. Möröy zur Verfügung gestellt wurde. Von den insgesamt 19 Mäusen waren 5 Wildtyp-Kontrollmäuse (+/+), 5 heterozygote Mäuse (-/+) und die restlichen 9 homozygot (-/-) Gfi-1-defizient. Mit einem murinen LBP-ELISA wurde die konstitutiven LBP-Konzentrationen der allesamt unstimulierten Mäuse gemessen (Abb. 44). Die LBP-Konzentrationen in den Wildtyp-Mäusen zeigten große Schwankungen, lagen aber im Mittel bei etwa 1,2 µg/ml LBP. In den heterozygoten Mäusen wurde im Mittel annähernd die gleiche LBP-Konzentration gemessen. In den homozygot Gfi-1-defizienten Mäusen lag die LBP-Konzentration mit etwa 2 µg/ml deutlich darüber und war im Vergleich zu den heterozygoten Mäusen signifikant erhöht.

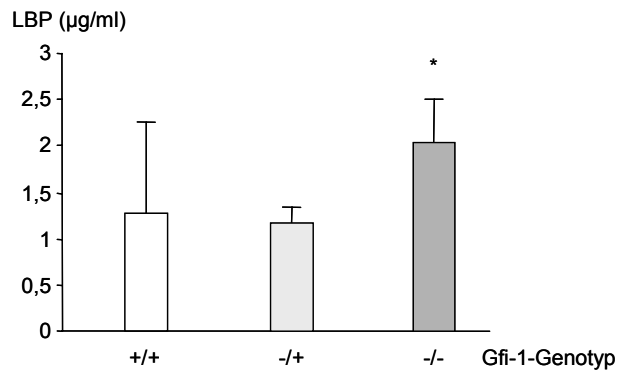


Abb. 44: LBP-Serumkonzentrationen in unstimulierten Gfi-1-defizienten Mäusen

Im Serum von wt-Mäusen (5) und heterozygot (5) und monozygot (9) Gfi-1-defizienten Mäusen wurde die LBP-Konzentration mit einem murinen LBP-ELISA gemessen. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

*Signifikant erhöht gegenüber heterozygoten Mäusen.

7 Die Expression von LBP in der Lungenepithelzelllinie A-549

Der hauptsächliche Syntheseort von LBP ist die Leber, aber es wird auch in anderen Organen exprimiert, z.B. in Lungen- oder Darmepithelzellen. Hier werden Versuche dargestellt, die mit den Lungenepithelzelllinie A-549 durchgeführt wurden. Diese Zelllinie exprimiert LBP und wurde verwendet, um einige zuvor erzielte Ergebnisse zu überprüfen bzw. um zu untersuchen, ob sich die LBP-Expression in Zelllinien aus verschiedenen Geweben unterscheidet.

Die LBP-Expression der Lungenzelllinie war ebenfalls mit IL-1, IL-6 und Dex stimulierbar, wobei IL-1 und IL-6 einen geringeren Effekt zeigten als in den Leberzelllinien. Die Aktivierung der Zellen wurde überraschenderweise vor allem durch Dex angeregt: Die alleinige Gabe von Dex führte schon zu einer starken Zunahme der LBP-Expression, die in den Hepatomzelllinien nicht zu beobachten war. Von diesem hohen Niveau ausgehend war der Synergieeffekt mit IL-6 entsprechend geringer. Die stimulierende Wirkung von IL-6 allein war gering, außerdem war kein Synergieeffekt zwischen IL- und IL-6 zu beobachten (Abb. 45).

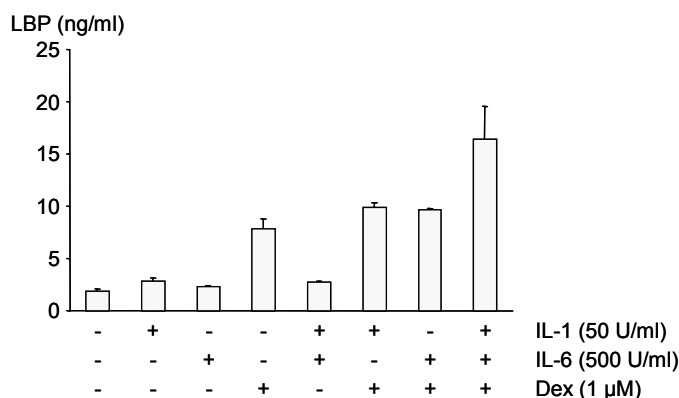


Abb. 45: IL-1- IL-6- und Dex-Effekte auf die LBP-Expression in A-549-Zellen

Die Lungenepithelzelllinie A-549 wurde wie angezeigt mit IL-1, IL-6 und Dex für 48 Stunden stimuliert. Danach wurde in den Kulturüberständen mit Hilfe des hLBP-ELISA die LBP-Konzentration bestimmt.

Die Lungenzellen reagierten auch sensibler auf Dex im Vergleich zu den Hepatomzellen. Bei Inkubation mit einer Dex-Konzentrationsreihe von 0 / 0,1 / 1 und 10 µM Dex genügten schon 0,1 µM Dex, um die maximale Expression von LBP zu bewirken. Es war also, verglichen mit den Leberzellen, nur ein Zehntel der Dex-Konzentration für den maximalen stimulatorischen Effekt notwendig (Abb. 46).

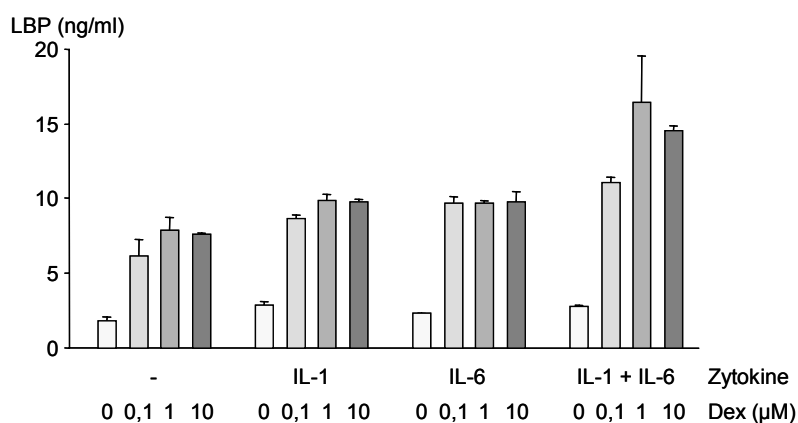


Abb. 46: Der Einfluss von Dex auf die LBP-Expression in A-549-Zellen

A-549-Zellen wurden wie angezeigt mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und mit ansteigenden Dex-Konzentrationen stimuliert. Nach 48 Stunden Stimulation wurde in den Kulturüberständen die LBP-Konzentration mit dem hLBP-ELISA gemessen.

Die TGF-β1-induzierte Hemmung des mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 µM Dex aktivierten LBP-Promotors konnte an den A-549-Zellen ebenfalls nachgewiesen werden. Bei zunehmender TGF-β1-Konzentration konnte eine klare Dosis-Wirkungsabhängigkeit auf die Inhibition des aktiven LBP-Promotors gezeigt werden (Abb. 47A). Die Inkubation von IL-10 zeigte auch hier wie in den HepG2- und HuH-7-Zellen keine messbaren Hemmeffekte auf die LBP-Expression (Abb. 47B).

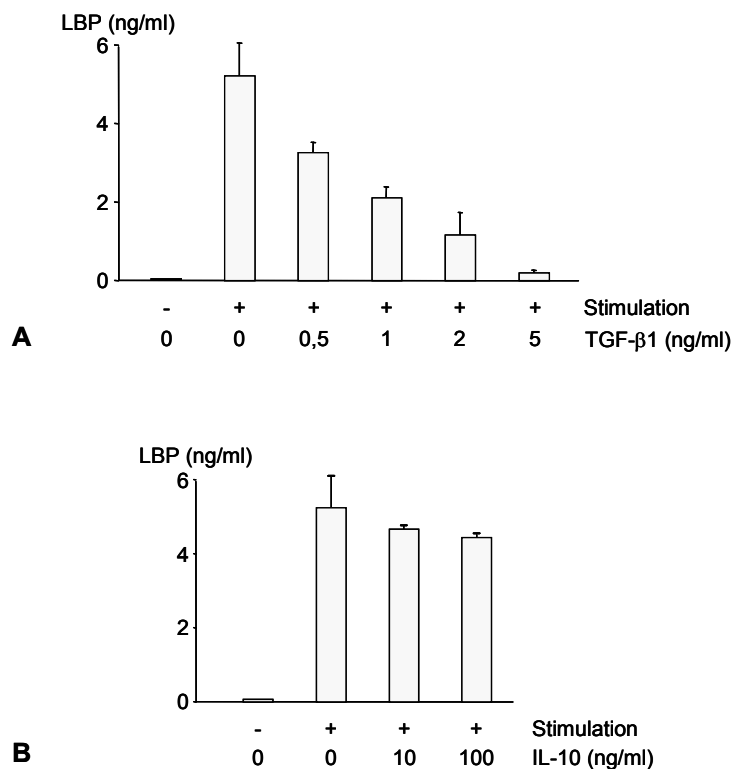


Abb. 47: Die Wirkung von TGF-β1 und IL-10 auf die induzierte LBP-Expression in A-549-Zellen

A-549-Zellen wurden mit 50 U/ml IL-1, 500 U/ml IL-6 und 1 μM Dex maximal stimuliert, zusätzlich wurde TGF-β1 in zunehmender Konzentration zusammen mit den Stimulanzien inkubiert (A). Die maximal stimulierten Zellen wurden mit 10 oder 100 ng/ml IL-10 inkubiert (B). Nach 48 Stunden wurde die LBP-Konzentration in den Kulturüberständen bestimmt.

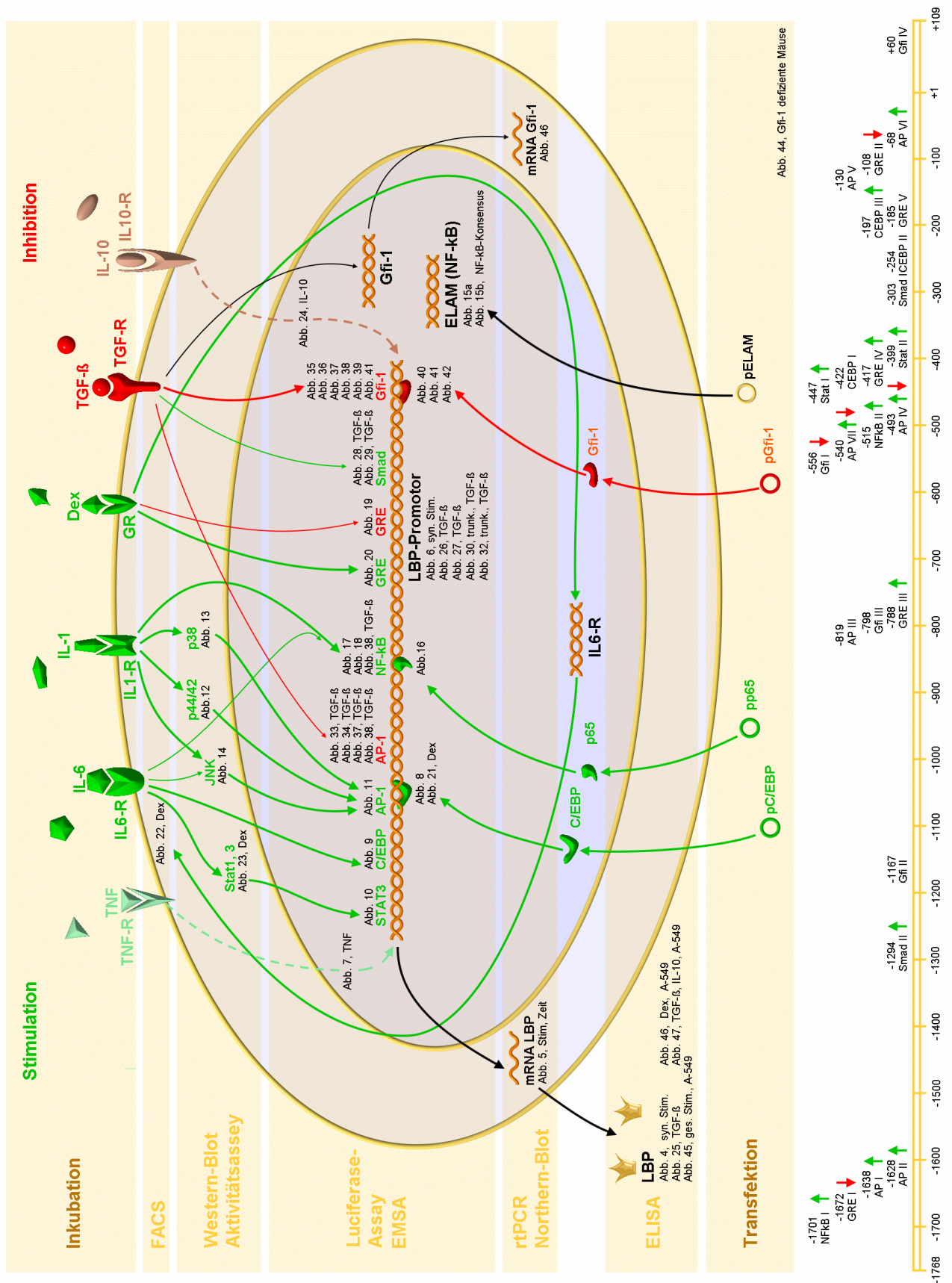
8 Übersicht der Ergebnisse

In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 48) sind die Ergebnisse in einer Übersicht zusammengefasst.

Die komplette Sequenz des LBP-Promotors mit den untersuchten potentiellen Bindungsstellen ist in Material und Methoden Abschnitt II 4.3 zu finden (Tabelle 3).

Abb. 48: Übersicht der Ergebnisse

(nachfolgende Seite) In den horizontalen Felder sind oben die für die Inkubation verwendeten Substanzen und unten die transfizierten Vektoren dargestellt. In den Feldern dazwischen sind die Ergebnisse nach den verwendeten Untersuchungsmethoden sortiert, dabei wird auf die dazugehörigen Abbildungen im Ergebnis teil verwiesen. Nachgewiesene stimulierende Effekte sind grün und inhibierende Effekte rot dargestellt. Unten in der Abbildung ist eine Übersicht der einzelnen untersuchten potentiellen Bindungsstellen mit der jeweiligen stimulierenden oder inhibierenden Wirkung, soweit nachgewiesen, dargestellt.



IV DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der LBP-Expression auf Promotor-, RNA- und Proteinebene untersucht, wobei der Schwerpunkt auf der Promotoranalyse lag, da LBP in erster Linie transkriptionell reguliert wird. Die Regulation involvierter Signaltransduktionswege in den verwendeten Hepatomzelllinien wurde ebenfalls analysiert. Dadurch konnte die Vermittlung aktivierender Effekte und deren Interaktion, wie z.B. der Synergieeffekt von Dex und IL-6 aufgeklärt werden. Der Vermittlung des TGF- β 1-Hemmeffekts auf die LBP-Expression wurde intensiv bearbeitet, da die hier beteiligten Mechanismen bisher nicht bekannt waren. So konnte die Vermittlung des TGF- β 1-Hemmeffekts im LBP-Promotor lokalisiert, und die Beteiligung des TF Gfi-1 gezeigt werden, der bis dato weder für LBP noch im Zusammenhang mit TGF- β 1 beschrieben worden war.

Der überwiegende Teil der Experimente wurde in den Hepatomzelllinien HepG2 und HuH-7 durchgeführt. HepG2-Zellen stammen aus einem kindlichen Hepatoblastom, HuH-7-Zellen aus einem hepatozellulären Karzinom [185, 193]. Sie haben sich schon bei der Induktion anderer Akutphaseproteine als geeignete Zelllinien erwiesen, um die Vorgänge in den Hepatozyten der humanen Leber während der Akutphase nachzubilden [194]. Kirschning konnte zeigen, dass diese Zelllinien auch für die Untersuchung der LBP-Regulation geeignet sind [195]. Unbehaun konnte diese Eignung bestätigen, indem sie zeigte, dass die Muster der LBP-mRNA-Akkumulation nach Stimulation mit IL-1, IL-6 und Dex in den Hepatomzelllinien und in isolierten primären Hepatozyten im Wesentlichen übereinstimmen [74]. Daher sind die beiden Zelllinien, soweit bekannt, gut geeignet, um die LBP-Expression zu untersuchen. Zelllinien bieten den bekannten Vorteil, dass die konstanten Kulturbedingungen besser reproduzierbare Ergebnisse liefern und dass das Zellmaterial in beliebiger Menge zur Verfügung steht, was bei primären Hepatozyten ein erhebliches Problem darstellt. Hier haben Zelllinien einen weiteren Vorteil: Auch nach sorgfältiger Aufreinigung des Lebergewebes kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Zellkultur mit nichtparenchymatösen Zellen kontaminiert ist. Daher können Primärkulturen mit Kupfferschen Sternzellen verunreinigt sein. Kupffersche Sternzellen produzieren in erheblichem Umfang Zytokine, z.B. die für die LBP-Stimulation verwendeten IL-1 und IL-6. Außerdem verstärkt IL-6 seine eigene Expression in Kupfferzellen. Durch diese Nebeneffekte ist ein kontrollierter Versuchsaufbau in Primärkulturen nur erschwert zu erreichen.

1 Die Aktivierung der LBP-Expression

1.1 IL-6 als Hauptinduktor der LBP-Expression

Betrachtet man die LBP-Expression auf allen drei untersuchten Ebenen - der transkriptionellen Aktivierung, der LBP-mRNA-Akkumulation und der Proteinkonzentration in den Kulturüberständen - so wird deutlich, dass IL-6 eine herausragende Bedeutung bei der Stimulierung von LBP zukommt und dass die stimulierende Wirkung von IL-6 ausschließlich oder zumindest zum allergrößten Teil auf transkriptioneller Ebene vermittelt wird. Nach IL-1- und Dex-Inkubation konnte in Bezug auf die Promotoraktivität eine zwar geringe, aber signifikante Stimulierung nachgewiesen werden. Die hauptsächliche Bedeutung von IL-1 und Dex liegt in den synergistischen Effekten mit IL-6. Die Synergie zwischen IL-1 und IL-6 ist auf transkriptioneller Ebene stark ausgeprägt und nimmt auf Proteinebene kaum noch zu. Demnach wird dieser Effekt transkriptionell oder vorgelagert, etwa bei der Signaltransduktion, induziert. Der Synergieeffekt zwischen Dex und IL-6 dagegen ist sowohl transkriptionell als auch nachgeordnet reguliert. Auf Promotorebene zeigen IL-6 und Dex einen klaren synergistischen Effekt, auf Proteinebene ist dieser Effekt noch deutlich verstärkt, was auf posttranskriptionelle Effekte hinweist. Der erhöhte Synergieeffekt zwischen IL-6 und Dex wurde von Unbehauen schon bei der LBP-mRNA-Akkumulation beobachtet [74]. Demnach müssten Teile des Dex/IL-6-Synergieeffektes auf RNA-Ebene reguliert werden, z.B. durch Erhöhung der mRNA-Stabilität.

Das dritte potentiell aktivierende Zytokin, das untersucht wurde, ist TNF- α , dem in der Akutphase eine herausragende Bedeutung zukommt [196]. Es hat nach den vorliegenden Ergebnissen überraschenderweise keinen oder nur einen marginalen Einfluss auf die LBP-Expression. Zum Teil konnten zwar geringe stimulatorische Effekte in Einzelexperimenten beobachtet werden, diese konnten jedoch nicht reproduziert werden.

Die IL-6-Wirkung kann über zwei bekannte Signalwege vermittelt werden: Der eine Signalweg führt zum NF-IL6 (C/EBP β) [148], der andere zu Stat-3 [196, 197]. Für beide Transkriptionsfaktoren (TF) sind auf dem LBP-Promotor mehrere Bindungsstellen vorhanden, von denen einige mutiert wurden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sowohl die Bindungsstellen als auch die beiden Signalwege aktiv und für die LBP-Expression wichtig sind. An Hand von Kotransfektionsexperimenten mit NF-IL6 konnte die direkte transkriptionelle Aktivierbarkeit des LBP-Promotors gezeigt und damit die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors bzw. Signalwegs bestätigt werden. Umkehrt hemmt eine dominante Negativmutante von C/EBP- β (NF-M 229) die Aktivität des stimulierten Promotors.

Die Wirkung von IL-6 kann auch über AP-1 vermittelt werden. Die AP-1-Aktivierung kann zum einen auf die Steigerung der transkriptionellen Aktivierung von Jun- und Fos-Proteinen zurückgeführt werden [138] und zum anderen auf die Erhöhung ihrer Stabilität [136]. Bei einer Aktivierung von AP-1 durch IL-6 konnte in HepG2-Zellen eine Erhöhung der c-jun mRNA nachgewiesen werden [198]. Auf dem LBP-Promotor gibt es zahlreiche aktive AP-1-

Bindungsstellen, die nicht nur nach Stimulierung von IL-6 in Kombination mit IL-1 die Promotoraktivität erhöhen, sondern auch nach alleiniger IL-6-Inkubation.

Die herausragende Bedeutung von IL-6 für die LBP-Expression korrespondiert auch mit der großen Anzahl an IL-6-responsiven TF-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor. Untersucht wurden durch Mutationsexperimente insgesamt 11 Elemente: drei C/EBP-, zwei Stat-3-Bindungsstellen und sechs AP-1-Elemente. Bei sieben dieser Bindungsstellen führte die mutative Veränderung zu einer reduzierten Aktivität des Promotors. Dazu kommen noch drei Elemente, deren Aktivität bereits früher nachgewiesen wurden [73].

1.2 Die IL-1-Wirkung: Der NF- κ B-Signalweg und die Synergie mit IL-6

Einerseits hat IL-1 allein nur eine geringe, aber signifikante LBP-aktivierende Wirkung. Andererseits befindet sich auf dem LBP-Promotor eine große Anzahl von AP-1-Bindungsstellen, die den Endpunkt eines wichtigen IL-1-Signalwegs darstellen [106, 199]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich zwei aktive NF- κ B-Elemente auf dem LBP-Promotor befinden. NF- κ B ist der TF des zweiten wichtigen IL-1-Signalwegs [200]. Die Vielzahl an Bindungsstellen könnte der Grund dafür sein, dass kein signifikanter direkter Einfluss von IL-1 auf einzelne AP-1-Elemente gezeigt werden konnte (nicht dargestellt): Verteilt sich der geringe direkte Einfluss von IL-1 auf mehrere Bindungsstellen, so wird der Effekt der einzelnen Bindungsstelle leicht von statistischen Schwankungen überlagert und ist dann möglicherweise nicht mehr signifikant nachzuweisen. Ebenso konnte keine alleinige Wirkung von IL-1 auf die beiden untersuchten NF- κ B Elemente ermittelt werden (nicht dargestellt).

Die Wirkung von IL-1 auf die LBP-Expression erhält aber wie gezeigt erst durch den synergistischen Effekt mit IL-6 seine volle Bedeutung. Die Kombination beider Zytokine führte zu einem stimulierenden Effekt hinsichtlich der LBP-Expression, der weit über die Addition der beiden Einzeleffekte hinausging. Dies war auch zu beobachten, wenn zusätzlich noch mit Dex stimuliert wurde.

Wie gezeigt werden konnte, ist der NF- κ B-Signalweg in den beiden Hepatomzelllinien aktiv, und es besteht zumindest bei der einen mit EMSA untersuchten potentiellen Bindungsstelle eine hohe spezifische Affinität zu NF- κ B, obwohl das Element etwas von der Konsensussequenz abweicht. Wurden nun die beiden NF- κ B-Bindungsstellen mutiert, zeigte sich ebenfalls, dass ihre stimulierenden Effekte über dem alleinigen Effekt von IL-1 lagen, obwohl für IL-6 allein keinerlei Indizien für eine Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs gefunden werden konnten. Diese Effekte könnten ihre Ursache im Zusammenwirken von NF- κ B-Bindungsstellen mit C/EBP β -Elementen haben. So ist das synergistische Zusammenspiel von C/EBP β - und NF- κ B-Bindungsstellen im SAA (serum amyloid A)-Promotor nachgewiesen worden [201]. Die Mutation von jeweils einer der beiden cis-agierenden C/EBP β - und NF- κ B-Bindungsstellen zeigte, dass NF- κ B für die Vermittlung der IL-1-Effekte, aber auch für den Synergie-Effekt verantwortlich ist. IL-6 allein hatte auch hier keinen Einfluss auf die NF- κ B-Sequenz. Die C/EBP β -Bindungsstelle vermittelte die IL-6-Effekte,

sie hatte aber nur mäßigen Einfluss auf die Synergie. Mit Hilfe einer Kotransfektion von p65 und p50 konnte dieser NF- κ B-C/EBP β -Synergieeffekt ebenfalls am SAA-Promotor bestätigt werden [202]. Der IL-6-Promotor selbst und der IL-8-Promotor enthalten ebenfalls die beiden Bindungsstellen und zeigen Synergieeffekte [203]. Dies entspricht in etwa den Verhältnissen auf dem LBP-Promotor: NF- κ B vermittelt den Synergieeffekt, aber keinen IL-6-Effekt; dieser wird von C/EBP vermittelt. Die einzelnen nachgewiesenen C/EBP- β -Effekte sind zwar schwach ausgeprägt, dies könnte aber auch hier an der großen Zahl von C/EBP-Elementen auf dem LBP-Promotor liegen.

Wie in Abschnitt 1.1 diskutiert, kann IL-6 bestimmte AP-1-Elemente sowohl transkriptionell aktivieren als auch ihre Stabilität fördern. Dieses erhöhte Angebot an AP-1 könnte nun auch zu einer effektiveren Phosphorylierung und damit Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktors durch die von IL-1 angestoßene Signalkaskade führen und so den IL-6/IL-1-Synergieeffekt erklären. Jedenfalls konnte anhand der Phosphorylierung von p44/p42 und p38 gezeigt werden, dass der IL-1-Signalweg zu AP-1 hin in den Hepatomzelllinien aktiv ist.

Ein weiterer interessanter Erklärungsansatz des IL-1/IL-6-Synergieeffekts ergab sich bei der Untersuchung der Aktivierbarkeit von JNK (nicht gezeigt): Alleinige IL-1-Stimulation führte wie zu erwarten zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von JNK und die Inkubation mit IL-6 allein zeigte keinerlei Effekte. Wurden aber die Zellen mit beiden Zytokinen gleichzeitig stimuliert, führte das zu einer verstärkten Phosphorylierung von JNK, die um ein Vielfaches über der nach Stimulation mit IL-1 allein lag. Demnach verstärkt IL-6 nicht nur die Expression und Stabilität von AP-1, sondern auch dessen Phosphorylierung, die notwendig ist, damit AP-1 als TF wirken kann. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses ergeben die Effekte der AP-1-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor ein schlüssiges Bild: Obwohl IL-1 allein nur einen geringen Einfluss auf den LBP-Promotor als Ganzes (und die AP-1-Elemente im einzelnen) hat und IL-6 allein schon einen starken Effekt über die AP-1-Bindungsstellen vermittelt, erhöht sich der über die AP-1-Elemente vermittelte stimulierende Effekt nach gemeinsamer Inkubation der beiden Zytokine synergistisch. Die Regulation von JNK ist äußerst komplex und wird durch viele MKKKs (MAP Kinase Kinase Kinase) beeinflusst. Es sind mindestens 13 MKKKs bekannt, die JNK regulieren [204]. Ein mittel- oder unmittelbarer Einfluss von IL-6 auf JNK ist in der Leber somit durchaus möglich, konnte so aber noch nicht gezeigt werden. Schuringa hat beispielsweise den Einfluss von IL-6 auf JNK-1 in HepG2-Zellen untersucht und keine Phosphorylierung von JNK-1 detektiert [205]. Dies entspricht auch dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, da bei alleiniger IL-6-Stimulation ebenfalls keine JNK-Aktivierung beobachtet werden konnte (nicht gezeigt). Zauberman hat ebenfalls die Signalübertragung in HepG2-Zellen untersucht und eine Aktivierung von p38 detektiert, aber keinen Effekt auf JNK festgestellt [206]. In der gastritischen Krebszelllinie AGS konnte Lin immerhin einen direkten Einfluss von IL-6 auf JNK nachweisen. IL-6 hat hierbei allerdings die Phosphorylierung von JNK gehemmt und nicht aktiviert [207].

1.3 Die Vermittlung der Dex-Effekte und der Synergieeffekt von IL-6 und Dex

Glukokortikoide wirken typischerweise entzündungshemmend und dämpfen die Immunabwehr, in der Leber aber wirken sie oft verstärkend auf die Regulation von APPs, die in die Immunabwehr involviert sind [113]. So wirkt Dex auch auf die Expression des Akutphase-Proteins LBP stimulierend. Allerdings hat dabei Dex allein keinen oder nur einen geringen stimulatorischen Effekt auf die LBP-Expression, es entfaltet seine Wirkung vielmehr in Kombination mit IL-6. Dex und IL-6 aktivieren auch die Expression anderer Akutphase-Proteine in HepG2, so z.B. des „C-reactive protein“ (CRP) [208].

Dex-Effekte wurden in den Hepatomzelllinien sowohl auf Promotorebene wie auch auf Proteinebene beobachtet. Beim „Insulin-like growth factor binding protein-1“ (IGFBP-1) konnte ebenfalls in HepG2-Zellen eine Erhöhung der Expressionsrate durch Dex-Inkubation gezeigt werden, die durch eine distinkte Promotorregion, also transkriptionell vermittelt wurde [209]. Auf dem LBP-Promotor befinden sich mehrere potentielle GRE-Bindungsstellen, von denen einige mutiert wurden. Überraschenderweise zeigte sich, dass zwei dieser Elemente die LBP-Expression hemmen und die anderen die Promotoraktivität steigern. Beide Arten der Dex-Wirkung sind in der Literatur beschrieben; interessant ist dabei, dass möglicherweise Unterschiede in der Sequenz der Nukleotide die unterschiedliche Wirkung von Dex verursachen [134]. In Tabelle 8 sind verschiedene in der Literatur beschriebene Konsensussequenzen des GR dargestellt. Die Konsensussequenz nach Signalscan 4.05 (Nr. 1), die zweimal auf dem LBP-Promotor vertreten ist (GRE I und II), entspricht in etwa dem halben Palindrom (W steht für A oder T). Auch andere beschriebene GR-Bindungssequenzen haben eine hohe Ähnlichkeit mit einer Palindromhälfte (Nr. 3, 8, 9). Das Promotoranalyseprogramm MatInspector verlangt bei der GRE-Bindungsstelle (Nr. 2) als Kernregion, die für die Bindung des Transkriptionsfaktors besonders wichtig ist, TGTY, wobei Y für C oder T steht. Die angrenzenden Bereiche sind eher variabel und können, vor allem wenn der TF in Wechselwirkung mit anderen Faktoren steht, von der Konsensussequenz abweichen (GRE III – V).

Tab. 8: GR-Konsensussequenzen und potentielle GR-Bindungsstellen

Nr.	Referenz / Name auf LBP-Prom.	Sequenz	Effekt
Konsensussequenzen			
1	[210, 211]	WC T<u>G</u>WTCT	
2	MatInspector GRE	GGTACA ANN T<u>G</u>IYCTK	
3	MatInspector GR	NNNNCN NTN T<u>G</u>INCT	
4	[212]	TGTACA GGA T<u>G</u>ITCT	
5	[213]	ACA NNN T<u>G</u>I	
6	[171]	GGTACA NNN T<u>G</u>ITCT	Stimulation
7	[171]	ATYACN NNN T<u>G</u>ATCW	Hemmung
8	[214]*	T<u>G</u>ISCC	
9	[215]*	T<u>G</u>ICCT	
Potentielle Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor			
(nach 1)	1672 (+) GRE I	GGGACA TTC T<u>G</u>ATCT	Hemmung
(nach 1)	108 (+) GRE II	CTCATC CAC T<u>G</u>ATCT	Hemmung
(nach 2)	788 (-) GRE III	AGGCTT CTA T<u>G</u>ITCA	Stimulation
(nach 2)	417 (+) GRE IV	GAGAAA CAC T<u>G</u>ITTT	Stimulation
(nach 2)	185 (-) GRE V	ATTCAT CAC T<u>G</u>ITCA	Inaktiv

*Auf dem LBP-Promotor befinden sich 5 potentielle Bindungsstellen nach Nr. 8 und eine nach Nr. 9, die nicht untersucht wurden.

Fett: Die weitgehend übereinstimmenden Basen bei allen Konsensussequenzen und den untersuchten potentiellen Bindungsstellen.

Unterstrichen: Base die evtl. hemmender oder stimulierender Effekte reguliert.

Betrachtet man die Gesamtheit der verschiedenen beschriebenen Konsensussequenzen für Glukokortikoid-Rezeptor, fällt auf, dass wohl eine Hälfte des Palindroms zu genügen scheint. Bezieht man sich auf das halbe Palindrom, so haben alle Konsensussequenzen die ersten beiden Basen T und G gemeinsam. An dritter Position ist A oder T möglich, die 4. Position ist weniger festgelegt, an der 5. Position befindet sich ein C und an der 6. ein T oder A. Diese geringfügigen Unterschiede in der Sequenz könnten ausreichen, damit der Rezeptor-Hormonkomplex in einer veränderten Konfiguration bindet. Dadurch würde die aktivierende Domäne nicht mehr mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren und so eine inhibierende Wirkung vermitteln [134, 171]. Geht man davon aus, dass die Palindromhälfte für die GR-Bindung genügt, so besteht nach Latchman der entscheidende Unterschied bei der Vermittlung von hemmender oder aktivierender Wirkung in der Bindungsstelle an der 3. Position (unterstrichen): Befindet sich an dieser Stelle ein T, so wirkt die Bindungsstelle stimulierend; befindet sich dort ein A, so wird ein hemmender Effekt vermittelt. Genau diesem Muster folgen die untersuchten GR-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor: Befindet sich an dieser dritten Stelle ein A, so wurde Hemmung beobachtet; befindet sich dort ein T, so wurde ein stimulatorischer Effekt gemessen. Dieser Unterschied in den untersuchten Dex-Bindungsstellen könnte demnach die Vermittlung von hemmender bzw. stimulierender Dex-Wirkung erklären.

Die hemmende und die aktivierende Wirkung der GR-bindenden Elemente scheinen sich im untersuchten System, also in den Hepatomzelllinien, nach alleiniger Dex-Stimulation oder in Kombination mit IL-1 und IL-6 in etwa die Waage zu halten. Die Stimulierung der Hepatomzellen mit Dex allein bewirkte nur eine geringe Erhöhung der Promotoraktivität. Der Synergieeffekt von Dex und IL-6 scheint maßgeblich nicht auf Promotorebene vermittelt zu werden, da die Überexpression von NF-IL6 in Kombination mit Dex-Stimulation zu keiner Synergie führte. Die durch den NF-IL6-Vektor verursachte NF-IL6-Expression überspringt die IL-6-Signaltransduktionskette und aktiviert direkt den LBP-Promotor. Würde der IL-6/Dex-Synergieeffekt auf der Wechselwirkung der TF GR und NF-IL6 beruhen, so sollte auch in diesem Experiment ein Synergieeffekt zu beobachten sein. Tatsächlich aber zeigte sich kein solcher Effekt.

In der A-549-Lungenepithelzelllinie führte schon die Inkubation von Dex allein zu einer starken Aktivierung der LBP-Expression. Im Gegenzug bewirkte die zusätzliche IL-6-Inkubation nicht in dem Maße einen Synergieeffekt, wie er in den Hepatomzelllinien zu beobachten war. Demnach könnte ein verändertes zelluläres Umfeld die Wirkung der hemmenden und stimulierenden Dex-Bindungsstellen zu Gunsten aktivierender Elemente verschieben. Diese an verschiedene Gewebetypen angepasste Wirkung von Dex auf die LBP-Transkription könnte auch eine Erklärung für die sich in den Leberzellen gegenseitig in ihrer Wirkung aufhebenden Dex-Bindungsstellen sein.

Der IL-6/Dex-Synergieeffekt ist in den Hepatomzelllinien schon auf Transkriptionsebene zu beobachten. Da er aber nicht direkt am Promotor vermittelt wird, muss er „upstream“ vermittelt werden, also in der Signalkette vom Rezeptor zum TF.

Schooltink hat gezeigt, dass Dex die Akkumulation der mRNA des IL-6-Korezeptors gp130 in HepG2-Zellen erhöht [216]. Dieser Einfluss von Dex auf mRNA-Ebene konnte in HepG2-Zellen auch bei anderen Proteinen gezeigt werden. Dex erhöht z.B. die mRNA-Akkumulation und Proteinausschüttung von Apolipoprotein (apo) A-I in HepG2 [217], und es reguliert die Insulin-Rezeptor-mRNA herauf [218]. Die Expression des „low density lipoprotein (LDL) receptor“ wird ebenfalls von Dex durch Erhöhung der mRNA-Akkumulation reguliert [219].

Eine Ursache für die Zunahme der mRNA-Stabilität durch Dex konnte von Diedrich gezeigt werden. Die 5'-untranslatierte Region (5'-UTL) der γ -Glutamyltransferase (GGT)-mRNA enthält ein sogenanntes „steroid hormone response element“ (HRE), das die mRNA stabilisiert und dadurch als translationaler Verstärker wirkt. In HepG2-Zellen wird durch die Bindung von Dex an diese Region deren stabilisierender Effekt verstärkt [220]. Solche oder ähnliche Effekte könnten zum einen für die Erhöhung der IL6-Rezeptor-mRNA-Akkumulation verantwortlich sein, aber auch direkt auf die LBP-mRNA wirken. Der stimulierende Dex-Effekt ist nämlich auf Protein-Ebene noch deutlich stärker ausgeprägt als auf Promotorebene, und daher sind posttranskriptionelle Effekte von Dex auf die LBP-Expression wahrscheinlich.

Die erhöhte Expression von gp130 und des eigentlichen IL-6-Rezeptors durch die Inkubation von Dex konnte direkt auf der Oberfläche der Hepatomzelllinien mit einer FACS-Analyse gezeigt

werden. Da eine Erhöhung der IL6-R-Expression nicht notwendigerweise zu einer verstärkten Aktivierung des IL-6-Signalwegs und letztlich zu der Vermittlung einer erhöhten Promotoraktivität führt, wurde die Transduktion des IL-6-Signals an Hand von Stat-1 und -3 untersucht. Die nachgewiesene verstärkte Aktivierung von Stat-3 und in geringerem Umfang auch von Stat-1 nach Dex-Inkubation schließt die Signalkette vom Rezeptor zum Promotor. Dex bewirkt demnach eine erhöhte Expression des IL-6-Rezeptors und seines Korezeptors gp130 und dies führt zu einer verstärkten Aktivierung des wichtigen IL-6-Signalwegs über Stat-3. Da ebenfalls aktive Stat-3-Bindungsstellen auf dem LBP-Promotor nachgewiesen werden konnten, wirkt der Dex/IL-6-Synergieeffekt auf die LBP-Expression zumindest zu einem relevanten Teil über die Verstärkung des IL-6-Effekts.

Zusammenfassend ergibt sich, dass sich auf dem LBP-Promotor mehrere aktive GR-Bindungsstellen befinden, wobei einige eine Stimulation und andere eine Hemmung des Promotors vermitteln. Dadurch neutralisieren sich die direkten Promotoreffekte einer Dex-Inkubation zumindest in den Hepatomzelllinien. Der beobachtete synergistische Effekt von Dex mit IL-6 wird wahrscheinlich vornehmlich durch die Dex-vermittelte Heraufregulierung des IL-6R erzielt.

2 Die Hemmung der LBP-Expression

2.1 Die Wirkung von TGF- β 1 auf die LBP-Expression

Die bisher beschriebenen Wirkungen von TGF- β 1 sind außerordentlich breit; Einflüsse von TGF- β 1 auf verschiedene Bereiche, z.B. die Embryonalentwicklung und Gewebsdifferenzierung sind beschrieben worden [126, 221]. Ob TGF- β 1 die Hemmung oder Induktion der Expression bestimmter Gene vermittelt, ist nicht nur von dem jeweiligen Gewebe oder der Zellart abhängig, sondern kann selbst in einer Zelllinie variieren, je nachdem mit welchen Faktoren TGF- β 1 kokubiert wird [124, 125]. Die Vermittlung der TGF- β 1-Wirkung erfolgt typischerweise über die sogenannten Smads, die sowohl als Signaltransduktions- als auch als Transkriptionsfaktoren dienen [123].

Es sind verschiedene Smad-bindende DNA-Sequenzen beschrieben, wobei die palindromische SBE (Smad binding element) -Sequenz mit der Basenfolge GTCTAGAC die wichtigste Bindungsstelle darstellt, an die bevorzugt Smad4-Homodimere binden [189]. Smad-Monomere benötigen nur das halbe Palindrom, das als Smad-Box bezeichnet wird [190]. Eine weitere Smad-Bindungsstelle ist die CAGA-Box, von der auch längere Versionen, CAGAC und CAGACA als regulierende Regionen beschrieben sind [191, 192, 222].

Auf dem LBP-Promotor befinden sich 10 potentielle Smad-Bindungsstellen und damit mehr Elemente, als nach einer zufälligen Häufigkeit der z.T. kurzen Bindungsstellen zu erwarten wäre. Insgesamt wurden 5 potentielle Smad-Bindungsstellen mit Hilfe von EMSA und/oder

Mutationsexperimenten untersucht. Bei der Smad-Sequenz -1294 bp wurde sowohl eine Proteinbindung als auch ein spezifischer Effekt auf die LBP-Promotoraktivität nachgewiesen. Diese Bindungsstelle vermittelt allerdings einen aktivierenden TGF- β 1-Effekt auf den Promotor, der sich auf geringem, aber signifikanten Niveau nach alleiniger TGF- β 1-Inkubation zeigt und nach Mutation der Bindungsstelle nicht mehr nachzuweisen ist. Dieses CAGAC-Motiv wird als ein Element beschrieben, das stimulierende TGF- β 1-Effekte vermittelt und daher mit den hier dargestellten Ergebnissen übereinstimmt.

Die flexible und breite Wirkung von TGF- β 1 wird auf molekularer Ebene von der Wechselwirkung der Smads mit anderen Transkriptionsfaktoren bestimmt. In *Xenopus* z.B. bewirkt die Interaktion von Smad mit FAST-1 (forkhead activin signal transducer-1) eine Bindung an ein ARE (activin response element)-Element [223]. Andere Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls mit Smads interagieren, sind TFE3, ATF-1, AML und AP-1 [224]. Diese häufig zu beobachtende Interaktion von Smad mit anderen TF könnte Ak-Bindungsstellen maskieren und so erklären, weshalb es nicht gelungen ist, das Protein, das im EMSA an die Smad-Bindungsstelle bei -1294 bp bindet, mit einem Supershift nachzuweisen.

Nachdem keine Smad-Bindungsstelle lokalisiert werden konnte, die den hemmenden TGF- β 1-Effekt vermittelt, wurde der LBP-Promotor systematisch untersucht. Dabei konnte durch Trunkationsanalysen die Hemmwirkung von TGF- β 1 auf eine kleine Region eingegrenzt werden. Dabei hat sich gezeigt, dass der TGF- β 1-Hemmeffekt eng mit der Aktivierbarkeit des Promotors verbunden ist. In dem Promotorfragment, das den TGF- β 1-Hemmeffekt vermittelt, liegen auch Elemente, die einen Teil der Promotoraktivität vermitteln. Mit Hilfe von Feintrunkationen und Mutationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass unter anderem zwei AP-1-Bindungsstellen in die Vermittlung des TGF- β 1-Hemmeffekts involviert sind.

Die regulatorische Wirkung von TGF- β 1 kann auf direkte und indirekte Art vermittelt werden. Zum einen binden durch TGF- β 1 aktivierte Smads direkt z.B. an den PAI-1-Promotor und regulieren dadurch seine Expression [222]. Zum Anderen scheinen besonders bei der Vermittlung von Hemmeffekten andere TF beteiligt zu sein, die als Korepressoren wirken. Beispielsweise wird die Entwicklung von Th2-Zellen durch TGF- β 1 unter der Mitwirkung des TF GATA-3 gehemmt [225]. Das Homeodomänen-Protein TGIF (TG3-interacting factor) bindet unter dem Einfluss von Smad an den Zielpromotor und hemmt so die Expression [226]. Das onkogene Produkt c-Ski agiert zusammen mit Smad2 ebenfalls als transkriptioneller Korepressor im TGF- β 1-Signalweg [227]. TGIF und s-Ski vermitteln die Bindung der „histone deacetylase“ (HDAC) an den Smad-Komplex und hemmen so die Transkription des Zielgens [228]. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch DEC1 in die Vermittlung von TGF- β 1-Hemmeffekten involviert ist [229].

Die Kopplung von AP-1 und TGF- β 1 bei der transkriptionellen Regulation konnte in jüngerer Zeit mehrmals gezeigt werden [157, 158, 159, 230]. TGF- β 1 hat in all diesen Fällen eine aktivierende Wirkung auf die Expression des entsprechenden Gens. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass zwei AP-1-Bindungsstellen, bei -536 bp und -493 bp,

die unter stimulierenden Konditionen an einer Aktivierung des Promotors beteiligt sind, nach zusätzlicher TGF- β 1-Inkubation zumindest teilweise den TGF- β 1-Hemmeffekt vermitteln.

In dem eingegrenzten DNA-Abschnitt, in dem der TGF- β 1-Hemmeffekt vermittelt wird, ist auch eine potentielle Gfi-1-Bindungsstelle lokalisiert, die nahezu der idealen Gfi-1-Konsensussequenz entspricht [188].

2.2 Gfi-1 als regulatorisches Element des LBP-Promotors

Überraschenderweise hat die Analyse des LBP-Promotors im Zusammenhang mit der TGF- β 1-Wirkung eine herausragende Bedeutung des noch wenig beschriebenen TF Gfi-1 ergeben. Gfi-1 ist ein inhibitorisch wirkender TF mit einer Zinkfinger-Domäne, die an die DNA bindet und einer evolutionär konservierten Repressordomäne SNAG, die den Hemmeffekt am Promotor vermittelt [169, 231].

Gfi-1-Bindungsstellen wurden auch in den Promotoren verschiedener APPs wie IL-1 α und IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ und TNF- α gefunden. Dies lässt vermuten, dass Gfi-1 eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zytokinen hat [167, 232]. Eigene Recherchen haben ergeben, dass Gfi-1-Bindungsstellen in großer Anzahl auch im MD-2-Promotor zu finden sind. MD-2 hat eine wichtige Bedeutung im TLR-Signalweg und damit bei den Regelkreisen der angeborenen Immunität.

Auf dem LBP-Promotor befinden sich mehrere potentielle Gfi-1-Bindungsstellen, wobei sich aber das Element mit der höchsten Übereinstimmung zur Gfi-1-Konsensussequenz in dem Abschnitt befindet, in dem auch der TGF- β 1-Effekt vermittelt wird. Diese potentielle Gfi-1-Bindungsstelle bei –556 bp (Gfi I) hat die Sequenz TAAATCACTGCT und korreliert mit einem core/matrix-Index von 1/0.98 fast perfekt mit der idealen Konsensussequenz. Die einzige Abweichung besteht in der letzten Base T, an deren Stelle sich in der Konsensussequenz ein A befindet [188]. Zweidler-McKay et al. haben in Selektionsexperimenten gezeigt, dass die Häufigkeit der Base A an der genannten Stelle 39 % beträgt und dass ein T mit einer Häufigkeit von 25 % vorkommt [167]. Mit diesem minimalen Unterschied zur idealen Gfi-1-bindenden Sequenz ist diese Bindungsstelle eines der „stärksten“ Elemente auf dem gesamten LBP-Promotor.

Die hier dargestellten Mutationsexperimente haben gezeigt, dass die Gfi-1-Bindungsstelle –556 bp in die Vermittlung der TGF- β 1-Hemmeffekte auf den Promotor involviert ist. Sowohl Punktmutationen als auch die Deletion der Gfi-1-Bindungsstelle haben im vollständigen Promotor und noch verstärkt im trunkierten Promotor zur Reduktion des TGF- β 1-Hemmeffektes geführt. Dieser Effekt ist noch deutlich stärker als bei der benachbarten AP-1-Bindungsstelle –540 bp. Die kombinierte Mutation der AP-1- und Gfi-1-Bindungsstellen hat ergeben, dass dem Gfi-1-Element eine herausragende Bedeutung bei der Regulation des Promotors zukommt. Wurde das AP-1-Motiv mutiert, reduzierte sich der TGF- β 1-Hemmeffekt. Bei zusätzlicher Mutation der Gfi-1-Bindungsstelle wurde der Hemmeffekt weiter reduziert. Im Gegensatz dazu hat die Gfi-1-Stelle einen dominanten Einfluss: Die Mutation der Gfi-1-Stelle reduzierte den Hemmeffekt sehr stark, und eine zusätzliche Mutation von AP-1 zeigte keinerlei weiteren Effekt. Die Gfi-1-Bindungsstelle

scheint absolut notwendig zu sein, um den TGF- β 1-Hemmeffekt zu vermitteln; das AP-1-Motiv hat dagegen nur eine nachgeordnete, quantitative Bedeutung.

Die besondere Bedeutung der Gfi-1-Bindungsstelle für die Aktivität des LBP-Promotors zeigte sich bei der Stimulierung des Promotors ohne TGF- β 1-Inkubation. Die Mutation der Gfi-1-Bindungsstelle führte in stimulierten Zellen zur stärksten Reduktion der Aktivierbarkeit des Promotors, die bei einer Einzelmutation überhaupt beobachtet wurde. Die Restaktivität des Promotors entspricht in der Mutanten in etwa der Aktivität der 463 bp langen Promotortrunkation, auf der sich weder die Gfi-1-Bindungsstellen noch die beiden AP-1- (-540 und -493 bp) und das NF- κ B-Element (-515 bp) befinden. Die AP-1-Bindungsstelle -540 bp und die NF- κ B-Stelle vermitteln selbst eine starke und AP-1 -493 bp eine geringere Aktivierbarkeit des Promotors. Die Addition der Einzeleffekte zusammen mit dem Effekt der Gfi-1-Stelle würde zu einem Einfluss führen, der weit über 100 % liegt. Diese Bindungsstellen bzw. die Faktoren, die daran binden, stehen demnach in starker Wechselwirkung, und das sowohl bei der Promotorstimulierung als auch bei seiner Hemmung.

2.3 Die Inhibierung aktiver Promotoren

Die Vermittlung inhibierender Promotoreffekte kann nach den theoretischen Modellen verschiedene Ursachen haben. Im Folgenden sollen die möglichen Mechanismen in Bezug auf den Gfi-1-vermittelten TGF- β 1-Hemmeffekt diskutiert werden.

Wird die Transkription eines (eukaryotischen) Gens eingeleitet, binden die Initiationsfaktoren, die RNA-Polymerase II und die Transkriptionsfaktoren an den Promotor. Damit ist dieser aktiviert, die Transkription wird gestartet. Dies ist unabhängig davon, ob der Promotor konstitutiv aktiv ist oder durch Faktoren induziert wird. Die Hemmung eines aktiven Promotors ist zwar ebenfalls ein aktiver Vorgang im Sinne eines streng regulierten und Energie verbrauchenden Vorgangs, es handelt sich letztlich jedoch immer um eine Be- oder Verhinderung der Transkription [132, 135].

Drei grundlegende Mechanismen der transkriptionellen Repression werden unterschieden:

Der Repressor verhindert die Bindung eines Aktivators an die DNA: Dabei kann er direkt oder überlappend an die DNA-Bindungsstelle des Aktivators binden und sie dadurch maskieren oder an den Aktivator binden und seine DNA-bindende Region blockieren.

Der Repressor behindert die Wirkung eines an die DNA gebundenen Aktivators: Der Inhibitor bindet z.B. benachbart zum Aktivator und behindert dadurch sterisch seinen Kontakt zum Transkriptionskomplex.

Bei der so genannten „echten“ Repression behindert eine distinkte Repressionsdomäne die Ausbildung des transkriptionellen Komplexes.

Überlappungen der verschiedenen Mechanismen sind dabei des öfteren zu finden. So hemmt bei Drosophila der transkriptionelle Repressor Rb die Aktivierungsdomäne des DNA-gebundenen E2F und verfügt zusätzlich über eine aktive Repressionsdomäne, mit der er an HDAC (Histondeacetylase) bindet [233, 234]. Ein anderes Beispiel ist DSP1, es hemmt bei Drosophila

sterisch die Aktivierungsdomäne des TF Dorsal und verhindert gleichzeitig die Bildung von PIC („preinitiation complex“; [235]. Verschiedene transkriptionelle Regulatoren sind in der Lage, die Transkription sowohl zu hemmen als auch zu aktivieren. Diese entgegengesetzte Eigenschaft ist z.B. bei dem Drosophila-Protein Krüppel zu finden, das in monomerer Form die Transkription aktiviert und als Dimer hemmend wirkt, da zwar die monomere Form, aber nicht die dimere Form Kontakt zu TFIIB aufnehmen kann. Umgekehrt interagiert das Dimer mit TFIIE, nicht aber das Monomer [236]. Bei anderen TF, wie z.B. Dorsal/DSP, E2F-Rb oder WT1, wird der Wechsel zwischen aktivierender und hemmender Wirkung durch die Bindung eines Kofaktors bewirkt. WT1 fungiert als Aktivator und wird zum Repressor, wenn ein löslicher nukleärer Faktor bindet (Übersichtsartikel: [135].

Jeder Hemmeffekt ist demnach eng mit aktivierenden Elementen verbunden. Die Wechselwirkung zwischen Aktivator und Inhibitor kann dabei leicht zu Störungen der Aktivierbarkeit des Promotors führen, z.B. wenn der Inhibitor selbst oder dessen Bindungsstelle Mutationen aufweisen.

Gfi-1 ist als „echter“ inhibierender TF beschrieben. Zum einen kann er mit der Zinkfingerdomäne an seine spezifische DNA-Sequenz binden, zum anderen bindet die SNAG-Region an aktivierende TF oder direkt an den Transkriptions-Startkomplex und unterbindet so die transkriptionelle Aktivierung. Eine Bindung von Gfi-1 an die DNA ist aber nicht zwingend notwendig, damit es sein inhibierendes Potential entfalten kann [169, 170, 231].

Die hier dargestellten Kotransfektionsexperimente mit dem pGfi-1-Plasmid bzw. mit der Mutanten pGfi^{Zn}, die nur die Zinkfingerregion trägt, und der Mutanten pGfi^{SNAG}, die nur die SNAG-Region beinhaltet haben gezeigt, dass die SNAG-Region nur bedingt notwendig ist damit Gfi-1 seine hemmende Wirkung gegenüber dem LBP-Promotor entfalten kann: Einerseits hatte die Kotransfektion der SNAG-Region allein im Vergleich zum mock-Kontrolle zu keiner Hemmung des LBP-Promotors geführt. Dagegen führte die Transfektion von pGfi^{Zn} zu einer deutlichen Reduktion der Promotoraktivität, die allerdings nicht so stark ausgeprägt war wie nach der Transfektion des vollständigen pGfi-1-Plasmids. Demnach ist die DNA-bindende Region notwendig zur Vermittlung des Hemmeffekts, aber nicht hinreichend für die maximale Wirkung, die erst mit der SNAG-Region erreicht wird. Die Wirkung von Gfi-1 auf den LBP-Promotor entspricht also nicht der bislang beschriebenen Wirkung von Gfi-1 als ‚echtem‘ Repressor mit einer aktiv hemmenden Domäne. Im Gegensatz zu der von Rodel gezeigten DNA-unabhängigen Hemmwirkung von Gfi-1 ist bei der Wirkung auf den LBP-Promotor die DNA-bindende Domäne unverzichtbar [170].

Diese Ergebnisse decken sich mit den Mutationsexperimenten am Promotor. Auch hierbei ist die Gfi-1-bindende Region notwendig, um den Gfi-1-Effekt zu vermitteln. Die Mutation der Bindungsstelle reduziert sowohl die Hemmung durch kotransfiziertes pGfi-1, wie auch die durch TGF-β1-Inkubation sehr stark, allerdings nicht vollständig. Dabei könnten evtl. die anderen auf dem Promotor liegenden potentiellen Gfi-1-Bindungsstellen die ausfallende Haupt-Gfi-1-Stelle zum Teil ersetzen. Jedenfalls sind für die Vermittlung des Hemmeffekts sowohl die Gfi-1-Bindungsstelle auf dem Promotor als auch die DNA-bindende Domäne auf dem Gfi-1-Protein notwendig.

Die Gfi-1-Wirkung auf den LBP-Promotor wurde demnach durch die Behinderung aktivierender Transkriptionsfaktoren vermittelt. Die Gfi-1-Bindungsstelle bei -556 und das AP-1-Element bei -540 bp überlappen sich zwar nicht, liegen aber nur durch 4 bp getrennt sehr eng beieinander, so dass eine Behinderung der AP-1-Bindung durch gebundenes Gfi-1 vorstellbar wäre. Für die zweite AP-1-Bindungsstelle (-493 bp) und das NF- κ B-Element (-515 bp) kann man eher von einer sterischen Behinderung der aktivierenden Faktoren bei der Kontaktaufnahme mit dem Transkriptionskomplex ausgehen, was im Übrigen auch für das AP-1-Element bei -540 bp zutreffen könnte.

Ein weiterer beobachteter Effekt ist, dass die Gfi-1-Bindungsstelle nicht nur inhibierende Effekte vermittelt, sondern auch für die Stimulation des LBP-Promotors notwendig ist. Die reduzierte Aktivierbarkeit des Promotors nach Deletion der Gfi-1-Bindungsstelle könnte noch durch die Verschiebung der relativen Lage von Transkriptionsfaktoren und Transkriptionskomplex und eine dadurch erzeugte Störung der Transkription erklärt werden. Die zweite Mutation von Gfi I, bei der nur zwei Basen ausgetauscht wurden, spricht jedoch dagegen. Die Länge der DNA bleibt hierbei unverändert, die Aktivierbarkeit des Promotors geht trotzdem stark zurück.

Da Gfi-1 bislang ausschließlich als inhibierender TF beschrieben wurde, können die beobachteten Effekte nur durch komplexere Strukturen erklärt werden, die sich bei der Aktivierung bzw. Hemmung des LBP-Promotors bilden:

1. Die hemmende Wirkung von TGF- β 1 könnte durch die Aktivierung der Gfi-1-Expression vermittelt werden, wobei das Gfi-1-Protein dann über die Gfi-1-Bindungsstelle die Hemmung vermittelt. Bei der Aktivierung des LBP-Promotors würde nach diesem Modell ein anderes, unbekanntes Protein an die Gfi-1-Bindungsstelle binden, das den aktivierenden Effekt vermittelt. Dies entspricht auch den Beobachtungen bei den EMSA-Experimenten, bei denen nach reiner Stimulierung ohne Inkubation von TGF- β 1 eine spezifische Bindung an die Gfi-1-Bindungsstelle gezeigt werden konnte. Dieses zweite Protein würde dabei ebenfalls die Gfi-1-Bindungsstelle präferieren und demnach wahrscheinlich ebenfalls eine DNA-bindende Zinkfinger-Domäne aufweisen. Außerdem müsste dieses Protein die gleiche oder annähernd gleiche Molekülgröße wie das 45 kDa große Gfi-1 aufweisen, da im Shift-Assay nach Stimulierung mit IL-1, IL-6 und Dex bzw. nach TGF- β 1-Inkubation kein Unterschied in der Molekülgröße des spezifisch gebundenen Proteins zu erkennen war. Diese hohe Übereinstimmung des stimulierenden und des hemmenden Faktors legt nahe, dass es sich um ein dem Gfi-1 verwandtes Protein handelt. Das eng verwandte Protein Gfi-1B kommt -zumindest in der beschriebenen Form- nicht in Frage, da es mit etwa 37 kDa deutlich kleiner ist als Gfi-1. Möglicherweise handelt es sich um einen bislang noch unbekannten Faktor. Durchsucht man beispielsweise die Proteindatenbanken SwissProt und TrEMBL nach Proteinen mit einer hohen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zu Gfi-1 erhält man über 300 Einträge (<http://www.expasy.org/tools/blast/>). Die Übereinstimmung bezieht sich dabei meist auf die Zinkfingerdomäne, es handelt sich dabei also um DNA-bindende Proteine. Potentiell kommt dabei jedes dieser Proteine in Frage, auch wenn es in einem anderen

Zusammenhang beschrieben wurde, es muss lediglich in etwa die gleiche Größe wie Gfi-1 aufweisen. Darüber hinaus findet man z.B. unter der „Accession Number Q9H6Z6“ den Eintrag „Hypothetical protein FLJ21628“, der auf ein potentes noch unbekanntes Protein verweist, das in der Größe in etwa Gfi-1 entspricht. Dieses Beispiel soll zeigen, dass auch in Zeiten nach Abschluss des humanen Genomprojekts noch Spielraum zur Entdeckung unbekannter Proteine vorhanden ist. Möglich wäre auch eine alternative Gfi-1-Isoform, die aus alternativem Spleißen hervorgegangen ist, sich aber nicht wesentlich in der Größe von Gfi-1 unterscheidet. Eng verwandte Proteine, die sowohl in der Vermittlung von stimulierenden als auch hemmenden Effekten auf die Signaltransduktion und die Transkription wirken, wurden des Öfteren beschrieben. So werden z.B. bei der Smad-vermittelten TGF- β 1-Signaltransduktion die auf die Transkription aktivierend wirkenden Smad2 und -3 bei Rezeptorbindung durch Phosphorylierung selbst aktiviert. Gehemmt werden diese durch die I-Smads (inhibierende Smads), die zwar auch an den Rezeptor binden und dadurch die Bindungsstelle maskieren, aber kein Signal weiterleiten können. Die I-Smads sind letztlich natürliche dominante Negativmutanten der aktivierenden Smads und diesen dadurch sehr ähnlich [237, 238].

2. Gfi-1 könnte durch bestimmte induzierte Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, von einem hemmenden zu einem aktivierenden TF werden bzw. umgekehrt. Signaltransduzierende Proteine oder TF werden in der Regel durch kleine oder punktuelle Modifikationen aktiviert und können dadurch ein Signal transportieren [239, 240]. Daher scheint es möglich, dass Gfi-1 an die DNA bindet, aber eine zusätzliche spezifische Modifikation entscheidet, ob seine Wirkung aktivierend oder hemmend auf den LBP-Promotor ist. Dieser Erklärungsansatz würde die identische Proteingröße im EMSA-Experiment gut erklären, da sich Modifikationen, wie z.B. eine Phosphorylierung im Shift-Assay, nicht zeigen lassen.

3. Die antagonistische Wirkung von Gfi-1 könnte auch durch einen Kofaktor erklärt werden, der durch Maskierung einer hemmenden oder aktivierenden Domäne die Gfi-1-Wirkung ins Gegenteil verkehrt. Dazu passt die Beschreibung von Grimes et al., dass die repressive Wirkung der SNAG-Region von Gfi-1 die Assoziation mit einem titrierbaren Protein voraussetzt [231]. Dies könnten ein anderer TF oder basale Elemente der Transkription sein oder eben auch ein Kofaktor, der zur Vermittlung des Hemmeffekts notwendig ist.

Im Übrigen ist die Gfi-1-Wirkung, wie schon beschrieben wurde, nicht zwingend mit einer DNA-Bindung verknüpft. Rödel et al. haben gezeigt, dass Gfi-1 an PIAS3, einen Stat-3-Inhibitor, bindet und ihn dadurch blockiert [170]. Die Stat-3-Aktivität wird dadurch erhöht und damit letztlich die IL-6-Wirkung verstärkt. Dieser DNA-unabhängige Wirkmechanismus zeigt zumindest, dass weitere Gfi-1-Effekte möglich erscheinen, deren Aufklärung vielleicht auch die Gfi-1-Wirkung auf dem LBP-Promotor erklären könnte.

Obwohl der Mechanismus der Gfi-1-Wirkung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, ist die Bedeutung sowohl der Gfi-1-Bindungsstelle -556 bp als auch des Gfi-1-Proteins nachgewiesen worden. Zusätzlich konnten noch die konstitutiven LBP-Spiegel von Gfi-1-defizienten Mäusen gemessen werden. Auf Grund der sehr limitierten Anzahl der Mäuse

konnte keine in vivo Stimulationsexperimente durchgeführt werden. Die vorläufigen Ergebnisse auf basalem LBP-Niveau haben jedoch gezeigt, dass die LBP-Konzentration in homozygot Gfi-1-defizienten Mäusen gegenüber heterozygoten Mäusen um 100% höher liegt. Auch dieses Ergebnis bestätigt die hemmende Wirkung von Gfi-1 auf die LBP-Expression.

3 Klinische Bedeutung von LBP und seiner Regulation

LBP ist ein Lipidtransferprotein, das die spontan sehr langsam ablaufende Diffusion von LPS-Monomeren zwischen LPS-Mizellen, HDL-Partikeln und Zellmembran unter Beteiligung von sCD14 beschleunigt [241]. Der Transfer zur Zelle führt über TLR-4 und MD-2 zur Zellaktivierung, wogegen der Transport zu HDL-Partikeln zur Inaktivierung des LPS führt [39, 64]. Der verstärkende LBP-Effekt wird schon innerhalb weniger Minuten über geringe, basal exprimierte LBP-Konzentrationen vermittelt. Nach einer Infektion steigt dann die LBP-Konzentration um etwa das 50-fache an. Dieser Anstieg bewirkt einen anti-inflammatorischen Effekt von LBP, der eine überschießende Dysregulation des Immunsystems zu vermeiden hilft [29]. Diese bivalente Funktion von LBP, das in geringer Konzentration die Immunantwort verstärkt und in hoher Konzentration unterdrückt, führt zu der Vorstellung, dass sowohl die vollständige Unterdrückung wie auch die Verstärkung der LBP-Expression klinisch relevant sein könnten. Da schon sehr geringe Konzentrationen von LBP ausreichen, um den LPS-verstärkenden Aspekt zu gewährleisten, könnte der Einsatz von anti-LBP-Antikörpern in Kombination mit der Unterdrückung der LBP-Neosynthese ein Weg sein, um die Inflammation therapeutisch zu beeinflussen. Andererseits könnte es in bestimmten Situationen, evtl. bei fortgeschrittenem klinischen Verlauf des septischen Schocks, durch die Verabreichung von hohen LBP-Konzentrationen zu einer schnelleren Beruhigung der überschießenden Immunantwort kommen. Daher ist es von besonderem Interesse, die Regulation der LBP-Expression im Detail zu verstehen. Die genaue Kenntnis der Wechselwirkung zwischen stimulierenden und inhibierenden Faktoren der LBP-Expression könnte möglicherweise mittelfristig einen wichtigen Beitrag zur Behandlung inflammatorischer Erkrankungen und akuter Infektionen bis hin zum septischen Schock erbringen. Die Aufklärung des TGF- β 1-Hemmeffekts auf die LBP-Expression könnte Grundlage für eine Hemmung der LBP-Produktion beim Menschen sein. Die direkte Behandlung mit TGF- β 1 kommt dabei kaum in Betracht, da TGF- β 1 ein sehr weites Wirkungsspektrum aufweist und mit entsprechend vielen Nebenwirkungen zu rechnen wäre. Würde dagegen ein Protein aus der Signaltransduktionskette mit starker selektiver Wirkung wie Gfi-1 verabreicht, könnte möglicherweise eine verstärkte LBP-Hemmung bei reduzierten Nebenwirkungen erreicht werden. Die genauen Zusammenhänge zwischen TGF- β 1, Gfi-1 und Hemmung der LBP-Expression bedürfen jedoch noch weiterer Erforschung und versprechen, weitere interessante und hilfreiche Ergebnisse zu liefern.

V ZUSAMMENFASSUNG

Das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP) ist ein überwiegend in der Leber synthetisiertes Akutphaseprotein. Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, wird von LBP gebunden und zu zellulären Rezeptoren transportiert, wodurch das angeborene Immunsystems aktiviert wird. Durch das Erkennen wichtiger Krankheitserreger nimmt LBP eine zentrale Position in der Infektabwehr ein.

In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem mit Hilfe der humanen Hepatomzelllinien HuH-7 und HepG2, sowie mit der Lungenepithelzelllinie A-549, die Regulation der LBP-Expression untersucht. Die LBP-Expression wird durch Interleukin (IL)-1, IL-6 und Dexamethason (Dex) induziert. Der wichtigste Stimulator ist dabei IL-6. Die IL-6-Wirkung wird vor allem über die Transkriptionsfaktoren (TF) Stat-3, C/EBP- β und AP-1 vermittelt. Dazu passend konnten auf dem LBP-Promotor für alle 3 TF mehrere aktive Bindungsstellen nachgewiesen werden. Die IL-1-Effekte werden ebenfalls über AP-1, aber auch über den TF NF- κ B vermittelt, für den ebenfalls aktive Bindungsstellen nachgewiesen werden konnten. Die Wirkung von Dex wird im Allgemeinen über „glucocorticoid responsive elements“ (GREs) vermittelt. Auf dem LBP-Promotor konnten mehrere aktive GREs nachgewiesen werden, wobei einige verstärkend und einige hemmend wirken. In den Hepatomzelllinien, in denen Dex vor allem in Synergie mit IL-6 aktivierend auf den LBP-Promotor wirkt, wird dieser Effekt durch die Aufregulation des IL-6-Rezeptors und damit durch eine Verstärkung des IL-6-Signalwegs bewirkt.

Die LBP-Expression kann durch TGF (Transforming Growth Factor)- β 1 gehemmt werden. Der wichtigste TGF- β 1-Signalweg, der über die sogenannten Smads führt, ist in den Hepatomzellen aktiv, vermittelt aber nicht den TGF- β 1-Hemmeffekt, sondern eine geringe stimulierende Wirkung, die bei alleiniger TGF- β 1-Inkubation auftritt. Die inhibierende Wirkung von TGF- β 1 wird durch eine Gfi-1- und zwei AP-1-Bindungsstelle vermittelt. Die Gfi-1-Bindungsstelle nimmt dabei eine herausragende Stellung ein. Sie ist sowohl für die Vermittlung aktivierender als auch inhibierender Effekte notwendig, wie hier erstmals gezeigt werden konnte.

Die Aufklärung der LBP-Regulation und dabei besonders die Hemmung der LBP-Expression kann mittelfristig dazu beitragen, den klinischen Verlauf von inflammatorischen und infektiösen Erkrankungen zu beeinflussen und bietet daher Potential für interessante neue Therapieansätze.

Literaturverzeichnis

- [1] Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune response, *Curr Opin Immunol* 9 [1], Seite 4-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9039775>
- [2] Hoffmann, J. A.; Kafatos, F. C.; Janeway, C. A. und Ezekowitz, R. A. (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity, *Science* 284 [5418], Seite 1313-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10334979>
- [3] Aderem, A. und Underhill, D. M. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu Rev Immunol* 17, Seite 593-623. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10358769>
- [4] Medzhitov, R. und Janeway, C., Jr. (2000): Innate immunity, *N Engl J Med* 343 [5], Seite 338-44. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10922424>
- [5] Aderem, A. und Ulevitch, R. J. (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature* 406 [6797], Seite 782-7.
- [6] Schroder, N. W.; Opitz, B.; Lamping, N.; Michelsen, K. S.; Zahringer, U.; Gobel, U. B. und Schumann, R. R. (2000): Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids*, *J Immunol* 165 [5], Seite 2683-93. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10946299>
- [7] Janeway, C. A., Jr. (1989): Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 [Pt 1], Seite 1-13.
- [8] Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (1997): Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition, *Cell* 91 [3], Seite 295-8.
- [9] Janeway, C. A.; Trafers, P.; Walport, M. und Shlomchik, M.J. (2002): *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- [10] Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R. (2002): Innate immune recognition, *Annu Rev Immunol* 20, Seite 197-216. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11861602>
- [11] Janeway, C. A., Jr. (1999): The role of self-recognition in receptor repertoire development. Members of the Janeway Laboratory, *Immunol Res* 19 [2-3], Seite 107-18. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10493166>
- [12] Seydel, U.; Koch, M. H. und Brandenburg, K. (1993): Structural polymorphisms of rough mutant lipopolysaccharides Rd to Ra from *Salmonella minnesota*, *J Struct Biol* 110 [3], Seite 232-43.
- [13] Westphal, O. und Lüderitz, O. (1954): Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien, *Angew Chemie* 66, Seite 407-17.

- [14] Gmeiner, J.; Luderitz, O. und Westphal, O. (1969): Biochemical studies on lipopolysaccharides of *Salmonella* R mutants. Investigations on the structure of the lipid A component, *Eur J Biochem* 7 [3], Seite 370-9.
- [15] Rietschel, E. T.; Kirikae, T.; Schade, F. U.; Mamat, U.; Schmidt, G.; Loppnow, H.; Ulmer, A. J.; Zahringer, U.; Seydel, U.; Di Padova, F. und et al. (1994): Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function, *Faseb J* 8 [2], Seite 217-25.
- [16] Brade, H.; Moll, H. und Rietschel, E. T. (1985): Structural investigations on the inner core region of lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* rough mutants, *Biomed Mass Spectrom* 12 [10], Seite 602-9.
- [17] Imoto, M.; Kusumoto, S.; Shiba, T.; Rietschel, E. T.; Galones, C. und Luderitz, O. (1985): Chemical structure of *Escherichia coli* lipid A, *Tetrahedron L* 26, Seite 907-8.
- [18] Beutler, B. und Rietschel, E. T. (2003): Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin, *Nat Rev Immunol* 3 [2], Seite 169-76. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12563300>
- [19] Pfeiffer, R. (1892): Untersuchungen über das Choleragift, *Zf. f. Hygiene* 11, Seite 393-412.
- [20] Rietschel, E. T. und Brade, H. (1992): Bacterial endotoxins, *Sci Am* 267 [2], Seite 54-61.
- [21] Watson, R. W.; Redmond, H. P. und Bouchier-Hayes, D. (1994): Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses, *J Leukoc Biol* 56 [1], Seite 95-103.
- [22] Kusunoki, T.; Hailman, E.; Juan, T. S.; Lichenstein, H. S. und Wright, S. D. (1995): Molecules from *Staphylococcus aureus* that bind CD14 and stimulate innate immune responses, *J Exp Med* 182 [6], Seite 1673-82. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7500012>
- [23] Tobias, P. S.; Soldau, K. und Ulevitch, R. J. (1986): Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum, *J Exp Med* 164 [3], Seite 777-93.
- [24] Schumann, R. R.; Leong, S. R.; Flaggs, G. W.; Gray, P. W.; Wright, S. D.; Mathison, J. C.; Tobias, P. S. und Ulevitch, R. J. (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein, *Science* 249 [4975], Seite 1429-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=2402637
- [25] Ramadori, G.; Meyer zum Buschenfelde, K. H.; Tobias, P. S.; Mathison, J. C. und Ulevitch, R. J. (1990): Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes, *Pathobiology* 58 [2], Seite 89-94.
- [26] Dentener, M. A.; Vreugdenhil, A. C.; Hoet, P. H.; Vernooy, J. H.; Nieman, F. H.; Heumann, D.; Janssen, Y. M.; Buurman, W. A. und Wouters, E. F. (2000): Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins, *Am J Respir Cell Mol Biol* 23 [2], Seite 146-53.
- [27] Vreugdenhil, A. C.; Dentener, M. A.; Snoek, A. M.; Greve, J. W. und Buurman, W. A. (1999): Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response, *J Immunol* 163 [5], Seite 2792-8.

- [28] Opal, S. M.; Scannon, P. J.; Vincent, J. L.; White, M.; Carroll, S. F.; Palardy, J. E.; Parejo, N. A.; Pribble, J. P. und Lemke, J. H. (1999): Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock, *J Infect Dis* 180 [5], Seite 1584-9.
- [29] Zweigner, J.; Gramm, H. J.; Singer, O. C.; Wegscheider, K. und Schumann, R. R. (2001): High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes, *Blood* 98 [13], Seite 3800-8.
- [30] Ulevitch, R. J. und Tobias, P. S. (1995): Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin, *Annu Rev Immunol* 13, Seite 437-57.
- [31] Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J. und Mathison, J. C. (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science* 249 [4975], Seite 1431-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=1698311
- [32] Lamping, N.; Hoess, A.; Yu, B.; Park, T. C.; Kirschning, C. J.; Pfeil, D.; Reuter, D.; Wright, S. D.; Herrmann, F. und Schumann, R. R. (1996): Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg 94, Lys 95, Lys 99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation, *J Immunol* 157 [10], Seite 4648-56.
- [33] Tobias, P. S.; Soldau, K. und Ulevitch, R. J. (1989): Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein, *J Biol Chem* 264 [18], Seite 10867-71.
- [34] Tall, A. (1995): Plasma lipid transfer proteins, *Annu Rev Biochem* 64, Seite 235-57.
- [35] Kirschning, C. J.; Au-Young, J.; Lamping, N.; Reuter, D.; Pfeil, D.; Seilhamer, J. J. und Schumann, R. R. (1997): Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins, *Genomics* 46 [3], Seite 416-25.
- [36] Tobias, P. S.; Mathison, J. C. und Ulevitch, R. J. (1988): A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis, *J Biol Chem* 263 [27], Seite 13479-81.
- [37] Dentener, M. A.; Von Asmuth, E. J.; Francot, G. J.; Marra, M. N. und Buurman, W. A. (1993): Antagonistic effects of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein on lipopolysaccharide-induced cytokine release by mononuclear phagocytes. Competition for binding to lipopolysaccharide, *J Immunol* 151 [8], Seite 4258-65.
- [38] Wurfel, M. M.; Kunitake, S. T.; Lichenstein, H.; Kane, J. P. und Wright, S. D. (1994): Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS, *J Exp Med* 180 [3], Seite 1025-35.

- [39] Wurfel, M. M. und Wright, S. D. (1997): Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid, *J Immunol* 158 [8], Seite 3925-34.
- [40] Gegner, J. A.; Ulevitch, R. J. und Tobias, P. S. (1995): Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14, *J Biol Chem* 270 [10], Seite 5320-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7534294>
- [41] Schumann, R. R. und Latz, E. (2000): Lipopolysaccharide-binding protein, *Chem Immunol* 74, Seite 42-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10608081
- [42] Lamping, N.; Dettmer, R.; Schroder, N. W.; Pfeil, D.; Hallatschek, W.; Burger, R. und Schumann, R. R. (1998): LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria, *J Clin Invest* 101 [10], Seite 2065-71.
- [43] Hamann, L.; Schumann, R. R.; Flad, H. D.; Brade, L.; Rietschel, E. T. und Ulmer, A. J. (2000): Binding of lipopolysaccharide (LPS) to CHO cells does not correlate with LPS-induced NF-kappaB activation, *Eur J Immunol* 30 [1], Seite 211-6.
- [44] Weber, J. R.; Freyer, D.; Alexander, C.; Schroder, N. W.; Reiss, A.; Kuster, C.; Pfeil, D.; Tuomanen, E. I. und Schumann, R. R. (2003): Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein, *Immunity* 19 [2], Seite 269-79. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12932360
- [45] Fan, X.; Stelter, F.; Menzel, R.; Jack, R.; Spreitzer, I.; Hartung, T. und Schutt, C. (1999): Structures in *Bacillus subtilis* are recognized by CD14 in a lipopolysaccharide binding protein-dependent reaction, *Infect Immun* 67 [6], Seite 2964-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10338506>
- [46] Schroder, N. W.; Morath, S.; Alexander, C.; Hamann, L.; Hartung, T.; Zahringer, U.; Gobel, U. B.; Weber, J. R. und Schumann, R. R. (2003): Lipoteichoic acid (LTA) of *S. pneumoniae* and *S. aureus* activates immune cells via toll-like receptor (TLR)-2, LPS binding protein (LBP) and CD14 while TLR-4 and MD-2 are not involved, *J Biol Chem* 278, Seite 19. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12594207>
- [47] Wright, S. D. und Jong, M. T. (1986): Adhesion-promoting receptors on human macrophages recognize *Escherichia coli* by binding to lipopolysaccharide, *J Exp Med* 164 [6], Seite 1876-88.
- [48] Hampton, R. Y.; Golenbock, D. T.; Penman, M.; Krieger, M. und Raetz, C. R. (1991): Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors, *Nature* 352 [6333], Seite 342-4.
- [49] Kobayashi, Y.; Miyaji, C.; Watanabe, H.; Umezue, H.; Hasegawa, G.; Abo, T.; Arakawa, M.; Kamata, N.; Suzuki, H.; Kodama, T. und Naito, M. (2000): Role of macrophage scavenger receptor

- in endotoxin shock, *J Pathol* 192 [2], Seite 263-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11004705>
- [50] Goyert, S. M.; Ferrero, E.; Rettig, W. J.; Yenamandra, A. K.; Obata, F. und Le Beau, M. M. (1988): The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors, *Science* 239 [4839], Seite 497-500. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://locus.umdj.edu/ccr/ccr_cgi/pubmed.cgi%3f2448876
- [51] Pugin, J.; Heumann, I. D.; Tomasz, A.; Kravchenko, V. V.; Akamatsu, Y.; Nishijima, M.; Glauser, M. P.; Tobias, P. S. und Ulevitch, R. J. (1994): CD14 is a pattern recognition receptor, *Immunity* 1 [6], Seite 509-16.
- [52] Haziot, A.; Chen, S.; Ferrero, E.; Low, M. G.; Silber, R. und Goyert, S. M. (1988): The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage, *J Immunol* 141 [2], Seite 547-52.
- [53] Anderson, K. V.; Jurgens, G. und Nusslein-Volhard, C. (1985): Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product, *Cell* 42 [3], Seite 779-89.
- [54] Lemaitre, B.; Nicolas, E.; Michaut, L.; Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell* 86 [6], Seite 973-83.
- [55] Medzhitov, R.; Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C. A., Jr. (1997): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity, *Nature* 388 [6640], Seite 394-7.
- [56] Martin, M. U. und Wesche, H. (2002): Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family, *Biochim Biophys Acta* 1592 [3], Seite 265-80. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12421671>
- [57] Takeda, K. und Akira, S. (2003): Toll receptors and pathogen resistance, *Cell Microbiol* 5 [3], Seite 143-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12614458>
- [58] Aliprantis, A. O.; Yang, R. B.; Mark, M. R.; Suggett, S.; Devaux, B.; Radolf, J. D.; Klimpel, G. R.; Godowski, P. und Zychlinsky, A. (1999): Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2, *Science* 285 [5428], Seite 736-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10426996>
- [59] Underhill, D. M.; Ozinsky, A.; Hajjar, A. M.; Stevens, A.; Wilson, C. B.; Bassetti, M. und Aderem, A. (1999): The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens, *Nature* 401 [6755], Seite 811-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10548109>
- [60] Opitz, B.; Schroder, N. W.; Spreitzer, I.; Michelsen, K. S.; Kirschning, C. J.; Hallatschek, W.; Zahring, U.; Hartung, T.; Gobel, U. B. und Schumann, R. R. (2001): Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation, *J Biol Chem* 276 [25], Seite 22041-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11285258>

- [61] Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M. Y.; Huffel, C. V.; Du, X.; Birdwell, D.; Alejos, E.; Silva, M.; Galanos, C.; Freudenberg, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Layton, B. und Beutler, B. (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene, *Science* 282 [5396], Seite 2085-8.
- [62] Qureshi, S. T.; Lariviere, L.; Leveque, G.; Clermont, S.; Moore, K. J.; Gros, P. und Malo, D. (1999): Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4), *J Exp Med* 189 [4], Seite 615-25.
- [63] Arbour, N. C.; Lorenz, E.; Schutte, B. C.; Zabner, J.; Kline, J. N.; Jones, M.; Frees, K.; Watt, J. L. und Schwartz, D. A. (2000): TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans, *Nat Genet* 25 [2], Seite 187-91. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10835634>
- [64] Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y.; Fukudome, K.; Miyake, K. und Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll- like receptor 4, *J Exp Med* 189 [11], Seite 1777-82.
- [65] Dziarski, R.; Wang, Q.; Miyake, K.; Kirschning, C. J. und Gupta, D. (2001): MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram- positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components, *J Immunol* 166 [3], Seite 1938-44.
- [66] Visintin, A.; Mazzoni, A.; Spitzer, J. A. und Segal, D. M. (2001): Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [21], Seite 12156-61.
- [67] Alexopoulou, L.; Holt, A. C.; Medzhitov, R. und Flavell, R. A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll- like receptor 3, *Nature* 413 [6857], Seite 732-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11607032>
- [68] Hayashi, F.; Smith, K. D.; Ozinsky, A.; Hawn, T. R.; Yi, E. C.; Goodlett, D. R.; Eng, J. K.; Akira, S.; Underhill, D. M. und Aderem, A. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll- like receptor 5, *Nature* 410 [6832], Seite 1099-103. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11323673>
- [69] Hemmi, H.; Kaisho, T.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Sanjo, H.; Hoshino, K.; Horiuchi, T.; Tomizawa, H.; Takeda, K. und Akira, S. (2002): Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88- dependent signaling pathway, *Nat Immunol* 3 [2], Seite 196-200. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11812998>
- [70] Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H.; Matsumoto, M.; Hoshino, K.; Wagner, H.; Takeda, K. und Akira, S. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature* 408 [6813], Seite 740-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11130078>
- [71] Baumann, H. und Gauldie, J. (1994): The acute phase response, *Immunol Today* 15 [2], Seite 74-80.

- [72] Gabay, C. und Kushner, I. (1999): Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *N Engl J Med* 340 [6], Seite 448-54.
- [73] Schumann, R. R.; Kirschning, C. J.; Unbehauen, A.; Aberle, H.; Knopf, H. P.; Lamping, N.; Ulevitch, R. J. und Herrmann, F. (Reprint Author) (1996): The lipopolysaccharide binding protein is a secretory class 1 acute phase protein whose gene is transcriptionally activated by *aprf/stat 3* and other cytokine inducible nuclear proteins, *Molecular And Cellular Biology*. Jul 16 [7], Seite 3490-3503.
- [74] Unbehauen, A. (1999): Die Expression des Lipopolysaccharid Bindenden Proteins (LBP), Dissertation, Fachbereich Medizin, Humboldt-Universität Berlin.
- [75] Fiedler, G. (1998): Die Wirkung anti-inflammatorischer Zytokine auf die LBP-Transkript-Akkumulation in Hepatomzelllinien, Dissertation, Fachbereich Medizin, Humboldt-Universität Berlin.
- [76] Bone, R. C. (1995): Sepsis, sepsis syndrome, and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Gulliver in Laputa, Jama* 273 [2], Seite 155-6.
- [77] Sibbald, W. J.; Doig, G. und Inman, K. J. (1995): Sepsis, SIRS and infection, *Intensive Care Med* 21 [4], Seite 299-301.
- [78] Glauser, M. P.; Zanetti, G.; Baumgartner, J. D. und Cohen, J. (1991): Septic shock: pathogenesis, *Lancet* 338 [8769], Seite 732-6.
- [79] Rangel-Frausto, M. S.; Pittet, D.; Costigan, M.; Hwang, T.; Davis, C. S. und Wenzel, R. P. (1995): The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study, *Jama* 273 [2], Seite 117-23.
- [80] Darville, T.; Giroir, B. und Jacobs, R. (1993): The systemic inflammatory response syndrome (SIRS): immunology and potential immunotherapy, *Infection* 21 [5], Seite 279-90.
- [81] Allen, J. R.; Hightower, A. W.; Martin, S. M. und Dixon, R. E. (1981): Secular trends in nosocomial infections: 1970-1979, *Am J Med* 70 [2], Seite 389-92.
- [82] Parrillo, J. E.; Parker, M. M.; Natanson, C.; Suffredini, A. F.; Danner, R. L.; Cunnion, R. E. und Ognibene, F. P. (1990): Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy, *Ann Intern Med* 113 [3], Seite 227-42.
- [83] Vincent, J. L.; de Carvalho, F. B. und De Backer, D. (2002): Management of septic shock, *Ann Med* 34 [7-8], Seite 606-13. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12553501>
- [84] Borish, L. C. und Steinke, J. W. (2003): 2. Cytokines and chemokines, *J Allergy Clin Immunol* 111 [2 Suppl], Seite S460-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12592293>
- [85] Simpson, R. J.; Hammacher, A.; Smith, D. K.; Matthews, J. M. und Ward, L. D. (1997): Interleukin-6: structure-function relationships, *Protein Sci* 6 [5], Seite 929-55.
- [86] Gauldie, J.; Northemann, W. und Fey, G. H. (1990): IL-6 functions as an exocrine hormone in inflammation. Hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6, *J Immunol* 144 [10], Seite 3804-8.

- [87] Castell, J. V.; Gomez-Lechon, M. J.; David, M.; Andus, T.; Geiger, T.; Trullenque, R.; Fabra, R. und Heinrich, P. C. (1989): Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes, *FEBS Lett* 242 [2], Seite 237-9.
- [88] Tilg, H.; Trehu, E.; Atkins, M. B.; Dinarello, C. A. und Mier, J. W. (1994): Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55, *Blood* 83 [1], Seite 113-8.
- [89] Bot, F. J.; van Eijk, L.; Broeders, L.; Aarden, L. A. und Lowenberg, B. (1989): Interleukin-6 synergizes with M-CSF in the formation of macrophage colonies from purified human marrow progenitor cells, *Blood* 73 [2], Seite 435-7.
- [90] Suematsu, S.; Matsusaka, T.; Matsuda, T.; Ohno, S.; Miyazaki, J.; Yamamura, K.; Hirano, T. und Kishimoto, T. (1992): Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [1], Seite 232-5.
- [91] Fattori, E.; Cappelletti, M.; Costa, P.; Sellitto, C.; Cantoni, L.; Carelli, M.; Faggioni, R.; Fantuzzi, G.; Ghezzi, P. und Poli, V. (1994): Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice, *J Exp Med* 180 [4], Seite 1243-50.
- [92] Kopf, M.; Baumann, H.; Freer, G.; Freudenberg, M.; Lamers, M.; Kishimoto, T.; Zinkernagel, R.; Bluethmann, H. und Kohler, G. (1994): Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice, *Nature* 368 [6469], Seite 339-42.
- [93] Yamasaki, K.; Taga, T.; Hirata, Y.; Yawata, H.; Kawanishi, Y.; Seed, B.; Taniguchi, T.; Hirano, T. und Kishimoto, T. (1988): Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor, *Science* 241 [4867], Seite 825-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=3136546
- [94] Hibi, M.; Nakajima, K. und Hirano, T. (1996): IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system, *J Mol Med* 74 [1], Seite 1-12.
- [95] Taga, T.; Hibi, M.; Hirata, Y.; Yamasaki, K.; Yasukawa, K.; Matsuda, T.; Hirano, T. und Kishimoto, T. (1989): Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130, *Cell* 58 [3], Seite 573-81.
- [96] Luttkien, C.; Wegenka, U. M.; Yuan, J.; Buschmann, J.; Schindler, C.; Ziemiecki, A.; Harpur, A. G.; Wilks, A. F.; Yasukawa, K.; Taga, T. und et al. (1994): Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130, *Science* 263 [5143], Seite 89-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=8272872
- [97] Heinrich, P. C.; Behrmann, I.; Muller-Newen, G.; Schaper, F. und Graeve, L. (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem J* 334 [Pt 2], Seite 297-314. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.biochemj.org/bj/334/0297/bj3340297.htm>
<http://www.biochemj.org/bj/334/0297/bj3340297.htm>

- [98] Aktin, E (1960): The pathogenesis of fever, *Physiol Rev*, Seite 580-646.
- [99] Merriman, C. R.; Pulliam, L. A. und Kampschmidt, R. F. (1977): Comparison of leukocytic pyrogen and leukocytic endogenous mediator, *Proc Soc Exp Biol Med* 154 [2], Seite 224-7.
- [100] Dinarello, C. A. und Wolff, S. M. (1993): The role of interleukin-1 in disease, *N Engl J Med* 328 [2], Seite 106-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=8439348
- [101] Morikage, T.; Mizushima, Y.; Sakamoto, K. und Yano, S. (1990): Prevention of fatal infections by recombinant human interleukin 1 alpha in normal and anticancer drug-treated mice, *Cancer Res* 50 [7], Seite 2099-104.
- [102] Li, P.; Allen, H.; Banerjee, S.; Franklin, S.; Herzog, L.; Johnston, C.; McDowell, J.; Paskind, M.; Rodman, L.; Salfeld, J. und et al. (1995): Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock, *Cell* 80 [3], Seite 401-11.
- [103] Arend, W. P. (2002): The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease, *Cytokine Growth Factor Rev* 13 [4-5], Seite 323-40. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12220547>
- [104] Colotta, F.; Re, F.; Muzio, M.; Bertini, R.; Polentarutti, N.; Sironi, M.; Giri, J. G.; Dower, S. K.; Sims, J. E. und Mantovani, A. (1993): Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4, *Science* 261 [5120], Seite 472-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=8332913
- [105] Means, T. K.; Golenbock, D. T. und Fenton, M. J. (2000): The biology of Toll-like receptors, *Cytokine Growth Factor Rev* 11 [3], Seite 219-32.
- [106] Muegge, K.; Vila, M.; Gusella, G. L.; Musso, T.; Herrlich, P.; Stein, B. und Durum, S. K. (1993): Interleukin 1 induction of the c-jun promoter, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [15], Seite 7054-8.
- [107] Desilets, A.; Gheorghiu, I.; Yu, S. J.; Seidman, E. G. und Asselin, C. (2000): Inhibition by deacetylase inhibitors of IL-1-dependent induction of haptoglobin involves CCAAT/Enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells, *Biochem Biophys Res Commun* 276 [2], Seite 673-9.
- [108] Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N. und Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 [9], Seite 3666-70.
- [109] Wallach, D.; Varfolomeev, E. E.; Malinin, N. L.; Goltsev, Y. V.; Kovalenko, A. V. und Boldin, M. P. (1999): Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms, *Annu Rev Immunol* 17, Seite 331-67.
- [110] Derijard, B.; Raingeaud, J.; Barrett, T.; Wu, I. H.; Han, J.; Ulevitch, R. J. und Davis, R. J. (1995): Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK

isoforms, Science 267 [5198], Seite 682-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=7839144

[111] Ghosh, S.; May, M. J. und Kopp, E. B. (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses, Annu Rev Immunol 16, Seite 225-60.

[112] Schacke, H.; Docke, W. D. und Asadullah, K. (2002): Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids, Pharmacol Ther 96 [1], Seite 23-43. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12441176>

[113] Hadley, M. E. (2000): Endocrinology, Prentice Hall.

[114] Fiorentino, D. F.; Bond, M. W. und Mosmann, T. R. (1989): Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones, J Exp Med 170 [6], Seite 2081-95.

[115] Howard, M.; O'Garra, A.; Ishida, H.; de Waal Malefyt, R. und de Vries, J. (1992): Biological properties of interleukin 10, J Clin Immunol 12 [4], Seite 239-47.

[116] Tan, J. C.; Indelicato, S. R.; Narula, S. K.; Zavodny, P. J. und Chou, C. C. (1993): Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells, J Biol Chem 268 [28], Seite 21053-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=8407942

[117] Liu, Y.; Wei, S. H.; Ho, A. S.; de Waal Malefyt, R. und Moore, K. W. (1994): Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor, J Immunol 152 [4], Seite 1821-9.

[118] de Waal Malefyt, R.; Yssel, H.; Roncarolo, M. G.; Spits, H. und de Vries, J. E. (1992): Interleukin-10, Curr Opin Immunol 4 [3], Seite 314-20.

[119] Bogdan, C.; Vodovotz, Y. und Nathan, C. (1991): Macrophage deactivation by interleukin 10, J Exp Med 174 [6], Seite 1549-55.

[120] Howard, M.; Muchamuel, T.; Andrade, S. und Menon, S. (1993): Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia, J Exp Med 177 [4], Seite 1205-8.

[121] Gerard, C.; Bruyns, C.; Marchant, A.; Abramowicz, D.; Vandenabeele, P.; Delvaux, A.; Fiers, W.; Goldman, M. und Velu, T. (1993): Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia, J Exp Med 177 [2], Seite 547-50.

[122] Derynck, R.; Jarrett, J. A.; Chen, E. Y.; Eaton, D. H.; Bell, J. R.; Assoian, R. K.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B. und Goeddel, D. V. (1985): Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells, Nature 316, Seite 701-5.

[123] Massague, J. (1998): TGF-beta signal transduction, Annu Rev Biochem 67, Seite 753-91.

[124] Letterio, J. J. und Roberts, A. B. (1998): Regulation of immune responses by TGF-beta, Annu Rev Immunol 16, Seite 137-61.

[125] Markowitz, S. D. und Roberts, A. B. (1996): Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers [see comments], Cytokine Growth Factor Rev 7, Seite 93-102.

- [126] O'Kane, S. und Ferguson, M. W. (1997): Transforming growth factor beta s and wound healing, *Int J Biochem Cell Biol* 29, Seite 63-78.
- [127] Campos, S. P.; Wang, Y.; Koj, A. und Baumann, H. (1993): Divergent transforming growth factor-beta effects on IL-6 regulation of acute phase plasma proteins in rat hepatoma cells, *J Immunol* 151, Seite 7128-37.
- [128] Koj, A. (1998): Termination of acute-phase response: role of some cytokines and anti-inflammatory drugs, *Gen Pharmacol* 31 [1], Seite 9-18.
- [129] Mackiewicz, A.; Ganapathi, M. K.; Schultz, D.; Brabenec, A.; Weinstein, J.; Kelley, M. F. und Kushner, I. (1990): Transforming growth factor beta 1 regulates production of acute-phase proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, Seite 1491-5.
- [130] Morrone, G.; Cortese, R. und Sorrentino, V. (1989): Post-transcriptional control of negative acute phase genes by transforming growth factor beta, *Embo J* 8, Seite 3767-71.
- [131] Heldin, C. H.; Miyazono, K. und ten Dijke, P. (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, *Nature* 390 [6659], Seite 465-71.
- [132] Knippers, R. (2001): *Molekulare Genetik*, Thieme.
- [133] Tansey, W. P. (2001): Transcriptional activation: risky business, *Genes Dev* 15 [9], Seite 1045-50.
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11331599>
- [134] Latchman, D. S. (1995): *Eukaryotic Transcription Factors*, Academic Press, Seite 71-97.
- [135] Roberts, S. G. (2000): Mechanisms of action of transcription activation and repression domains, *Cell Mol Life Sci* 57 [8-9], Seite 1149-60.
- [136] Karin, M.; Liu, Z. g. und Zandi, E. (1997): AP-1 function and regulation, *Curr Opin Cell Biol* 9 [2], Seite 240-6.
- [137] Halazonetis, T. D.; Georgopoulos, K.; Greenberg, M. E. und Leder, P. (1988): c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities, *Cell* 55 [5], Seite 917-24.
- [138] Karin, M. (1995): The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases, *J Biol Chem* 270 [28], Seite 16483-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jbc.org/cgi/content/full/270/28/16483>
- [139] Wasylyk, B.; Wasylyk, C.; Flores, P.; Begue, A.; Leprince, D. und Stehelin, D. (1990): The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation, *Nature* 346 [6280], Seite 191-3.
- [140] Jonat, C.; Rahmsdorf, H. J.; Park, K. K.; Cato, A. C.; Gebel, S.; Ponta, H. und Herrlich, P. (1990): Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone, *Cell* 62 [6], Seite 1189-204.
- [141] Johnson, P. F.; Landschulz, W. H.; Graves, B. J. und McKnight, S. L. (1987): Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses, *Genes Dev* 1 [2], Seite 133-46.

- [142] Xanthopoulos, K. G.; Mirkovitch, J.; Decker, T.; Kuo, C. F. und Darnell, J. E., Jr. (1989): Cell-specific transcriptional control of the mouse DNA-binding protein mC/EBP, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [11], Seite 4117-21.
- [143] Poli, V. (1998): The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions, *J Biol Chem* 273 [45], Seite 29279-82.
- [144] Lekstrom-Himes, J. und Xanthopoulos, K. G. (1998): Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors, *J Biol Chem* 273 [44], Seite 28545-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9786841>
- [145] Akira, S.; Isshiki, H.; Sugita, T.; Tanabe, O.; Kinoshita, S.; Nishio, Y.; Nakajima, T.; Hirano, T. und Kishimoto, T. (1990): A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family, *Embo J* 9 [6], Seite 1897-906. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=2112087
- [146] Poli, V.; Mancini, F. P. und Cortese, R. (1990): IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP, *Cell* 63 [3], Seite 643-53.
- [147] Poli, V. und Cortese, R. (1989): Interleukin 6 induces a liver-specific nuclear protein that binds to the promoter of acute-phase genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [21], Seite 8202-6.
- [148] Akira, S. und Kishimoto, T. (1992): IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection, *Immunol Rev* 127, Seite 25-50.
- [149] Buck, M.; Turler, H. und Chojkier, M. (1994): LAP (NF-IL-6), a tissue-specific transcriptional activator, is an inhibitor of hepatoma cell proliferation, *Embo J* 13 [4], Seite 851-60.
- [150] Ramji, D. P. und Foka, P. (2002): CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation, *Biochem J* 365 [Pt 3], Seite 561-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12006103>
- [151] Darnell, J. E., Jr.; Kerr, I. M. und Stark, G. R. (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins, *Science* 264 [5164], Seite 1415-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=8197455
- [152] Ihle, J. N. und Kerr, I. M. (1995): Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily, *Trends Genet* 11 [2], Seite 69-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=7716810
- [153] Schindler, C. W. (2002): Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease, *J Clin Invest* 109 [9], Seite 1133-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11994400>

- [154] Li, Q. und Verma, I. M. (2002): NF-kappaB regulation in the immune system, *Nat Rev Immunol* 2 [10], Seite 725-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12360211>
- [155] Caamano, J. und Hunter, C. A. (2002): NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions, *Clin Microbiol Rev* 15 [3], Seite 414-29. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12097249>
- [156] Derynck, R.; Zhang, Y. und Feng, X. H. (1998): Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses, *Cell* 95 [6], Seite 737-40.
- [157] Zhang, Y.; Feng, X. H. und Derynck, R. (1998): Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription, *Nature* 394 [6696], Seite 909-13.
- [158] Liberati, N. T.; Datto, M. B.; Frederick, J. P.; Shen, X.; Wong, C.; Rougier-Chapman, E. M. und Wang, X. F. (1999): Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [9], Seite 4844-9.
- [159] Wong, C.; Rougier-Chapman, E. M.; Frederick, J. P.; Datto, M. B.; Liberati, N. T.; Li, J. M. und Wang, X. F. (1999): Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta, *Mol Cell Biol* 19 [3], Seite 1821-30.
- [160] Hocevar, B. A.; Brown, T. L. und Howe, P. H. (1999): TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway, *Embo J* 18 [5], Seite 1345-56.
- [161] Attisano, L. und Wrana, J. L. (2000): Smads as transcriptional co-modulators, *Curr Opin Cell Biol* 12 [2], Seite 235-43.
- [162] Derynck, R.; Gelbart, W. M.; Harland, R. M.; Heldin, C. H.; Kern, S. E.; Massague, J.; Melton, D. A.; Mlodzik, M.; Padgett, R. W.; Roberts, A. B.; Smith, J.; Thomsen, G. H.; Vogelstein, B. und Wang, X. F. (1996): Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals [letter], *Cell* 87, Seite 173.
- [163] Lagna, G.; Hata, A.; Hemmati-Brivanlou, A. und Massague, J. (1996): Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways, *Nature* 383 [6603], Seite 832-6.
- [164] Liu, F.; Hata, A.; Baker, J. C.; Doody, J.; Carcamo, J.; Harland, R. M. und Massague, J. (1996): A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator, *Nature* 381 [6583], Seite 620-3.
- [165] Wrana, J. L. und Attisano, L. (2000): The Smad pathway, *Cytokine Growth Factor Rev* 11, Seite 5-13.
- [166] Gilks, C. B.; Bear, S. E.; Grimes, H. L. und Tschlis, P. N. (1993): Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein, *Mol Cell Biol* 13 [3], Seite 1759-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=8441411

- [167] Zweidler-Mckay, P. A.; Grimes, H. L.; Flubacher, M. M. und Tsichlis, P. N. (1996): Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor, *Mol Cell Biol* 16 [8], Seite 4024-34.
- [168] Schmidt, T.; Karsunky, H.; Rodel, B.; Zevnik, B.; Elsasser, H. P. und Moroy, T. (1998): Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection, *Embo J* 17 [18], Seite 5349-59.
- [169] Tong, B.; Grimes, H. L.; Yang, T. Y.; Bear, S. E.; Qin, Z.; Du, K.; El-Deiry, W. S. und Tsichlis, P. N. (1998): The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation, *Mol Cell Biol* 18 [5], Seite 2462-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=9566867
- [170] Rodel, B.; Tavassoli, K.; Karsunky, H.; Schmidt, T.; Bachmann, M.; Schaper, F.; Heinrich, P.; Shuai, K.; Elsasser, H. P. und Moroy, T. (2000): The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3, *Embo J* 19 [21], Seite 5845-55.
- [171] Sakai, D. D.; Helms, S.; Carlstedt-Duke, J.; Gustafsson, J. A.; Rottman, F. M. und Yamamoto, K. R. (1988): Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene, *Genes Dev* 2, Seite 1144-54.
- [172] Hollenberg, S. M.; Weinberger, C.; Ong, E. S.; Cerelli, G.; Oro, A.; Lebo, R.; Thompson, E. B.; Rosenfeld, M. G. und Evans, R. M. (1985): Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA, *Nature* 318, Seite 635-41.
- [173] Akerblom, I. E.; Slater, E. P.; Beato, M.; Baxter, J. D. und Mellon, P. L. (1988): Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer, *Science* 241, Seite 350-3.
- [174] Drouin, J.; Trifiro, M. A.; Plante, R. K.; Nemer, M.; Eriksson, P. und Wrange, O. (1989): Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription, *Mol Cell Biol* 9, Seite 5305-14.
- [175] Mordacq, J. C. und Linzer, D. I. (1989): Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression, *Genes Dev* 3, Seite 760-9.
- [176] Ray, A.; LaForge, K. S. und Sehgal, P. B. (1990): On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion, *Mol Cell Biol* 10, Seite 5736-46.
- [177] Adler, S.; Waterman, M. L.; He, X. und Rosenfeld, M. G. (1988): Steroid receptor-mediated inhibition of rat prolactin gene expression does not require the receptor DNA-binding domain, *Cell* 52 [5], Seite 685-95.
- [178] Almawi, W. Y. und Tamim, H. (2001): Posttranscriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: glucocorticoids inhibit IL-6-induced proliferation of B9 hybridoma cells, *Cell Transplant* 10 [2], Seite 161-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11332630>

- [179] Cato, A. C. und Wade, E. (1996): Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids, *Bioessays* 18 [5], Seite 371-8.
- [180] Pfahl, M. (1993): Nuclear receptor/AP-1 interaction, *Endocr Rev* 14 [5], Seite 651-8.
- [181] Wilson, T. und Treisman, R. (1988): Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences, *Nature* 336 [6197], Seite 396-9.
- [182] Jacobson, A. und Peltz, S. W. (1996): Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells, *Annu Rev Biochem* 65, Seite 693-739.
- [183] Ming, X. F.; Kaiser, M. und Moroni, C. (1998): c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells, *Embo J* 17 [20], Seite 6039-48.
- [184] Winzen, R.; Kracht, M.; Ritter, B.; Wilhelm, A.; Chen, C. Y.; Shyu, A. B.; Muller, M.; Gaestel, M.; Resch, K. und Holtmann, H. (1999): The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism, *Embo J* 18 [18], Seite 4969-80.
- [185] Aden, D. P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I. und Knowles, B. B. (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma- derived cell line, *Nature* 282 [5739], Seite 615-6.
- [186] Lieber, M.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W. und Todaro, G. (1976): A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells, *Int J Cancer* 17 [1], Seite 62-70.
- [187] Schindler, U. und Baichwal, V. R. (1994): Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression, *Mol Cell Biol* 14 [9], Seite 5820-31. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7520526>
- [188] Quandt, K.; Frech, K.; Karas, H.; Wingender, E. und Werner, T. (1995): MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, *Nucleic Acids Res* 23 [23], Seite 4878-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.oup.co.uk/nar/Volume_23/Issue_23/5s0483_gml.abs.html
http://www.oup.co.uk/nar/Volume_23/Issue_23/5s0483_gml.abs.html
- [189] Zawel, L.; Dai, J. L.; Buckhaults, P.; Zhou, S.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. und Kern, S. E. (1998): Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators, *Mol Cell* 1 [4], Seite 611-7.
- [190] Shi, Y.; Wang, Y. F.; Jayaraman, L.; Yang, H.; Massague, J. und Pavletich, N. P. (1998): Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling, *Cell* 94, Seite 585-94.
- [191] Jonk, L. J.; Itoh, S.; Heldin, C. H.; ten, Dijke P. und Kruijer, W. (1998): Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer, *J Biol Chem* 273 [33], Seite 21145-52.

- [192] Massague, J. und Wotton, D. (2000): Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system, *Embo J* 19, Seite 1745-54.
- [193] Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T. und Sato, J. (1982): Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium, *Cancer Res* 42 [9], Seite 3858-63.
- [194] Lai, E. und Darnell, J. E., Jr. (1991): Transcriptional control in hepatocytes: a window on development, *Trends Biochem Sci* 16 [11], Seite 427-30.
- [195] Kirschning, C. J. (1996): Genomische Charakterisierung und Analyse der transkriptionellen Regulation des humanen Lipopolysaccharid Bindenden Proteins (LBP), Dissertation, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin.
- [196] Streetz, K. L.; Wustefeld, T.; Klein, C.; Manns, M. P. und Trautwein, C. (2001): Mediators of inflammation and acute phase response in the liver, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47 [4], Seite 661-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11502073>
- [197] Akira, S. (1997): IL-6-regulated transcription factors, *Int J Biochem Cell Biol* 29 [12], Seite 1401-18.
- [198] Wang, S. und Evers, B. M. (1998): Cytokine-mediated differential induction of hepatic activator protein-1 genes, *Surgery* 123 [2], Seite 191-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9481405>
- [199] O'Neill, L. A. und Greene, C. (1998): Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants, *J Leukoc Biol* 63 [6], Seite 650-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9620655>
- [200] O'Neill, L. A. (2000): The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense, *Sci STKE* 2000 [44], Seite RE1. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11752602>
- [201] Betts, J. C.; Cheshire, J. K.; Akira, S.; Kishimoto, T. und Woo, P. (1993): The role of NF-kappa B and NF-IL6 transactivating factors in the synergistic activation of human serum amyloid A gene expression by interleukin-1 and interleukin-6, *J Biol Chem* 268 [34], Seite 25624-31.
- [202] Shimizu, H. und Yamamoto, K. (1994): NF-kappa B and C/EBP transcription factor families synergistically function in mouse serum amyloid A gene expression induced by inflammatory cytokines, *Gene* 149 [2], Seite 305-10. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7959007>
- [203] Matsusaka, T.; Fujikawa, K.; Nishio, Y.; Mukaida, N.; Matsushima, K.; Kishimoto, T. und Akira, S. (1993): Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [21], Seite 10193-7.

- [204] Johnson, G. L. und Lapadat, R. (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science* 298 [5600], Seite 1911-2. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12471242>
- [205] Schuringa, J. J.; Jonk, L. J.; Dokter, W. H.; Vellenga, E. und Kruijer, W. (2000): Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components, *Biochem J* 347 Pt 1, Seite 89-96. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10727406>
- [206] Zauberman, A.; Zipori, D.; Krupsky, M. und Ben-Levy, R. (1999): Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3, *Oncogene* 18 [26], Seite 3886-93. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10445852>
- [207] Lin, M. T.; Juan, C. Y.; Chang, K. J.; Chen, W. J. und Kuo, M. L. (2001): IL-6 inhibits apoptosis and retains oxidative DNA lesions in human gastric cancer AGS cells through up-regulation of anti-apoptotic gene mcl-1, *Carcinogenesis* 22 [12], Seite 1947-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11751424>
- [208] Depraetere, S.; Willems, J. und Joniau, M. (1991): Stimulation of CRP secretion in HepG2 cells: cooperative effect of dexamethasone and interleukin 6, *Agents Actions* 34 [3-4], Seite 369-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1667244>
- [209] Powell, D.; Lee, P. D.; DePaolis, L. A.; Morris, S. L. und Suwanichkul, A. (1993): Dexamethasone stimulates expression of insulin-like growth factor binding protein-1 in HEP G2 human hepatoma cells, *Growth Regul* 3 [1], Seite 11-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7683515>
- [210] Claverie, J. M. und Sauvaget, I. (1985): Assessing the biological significance of primary structure consensus patterns using sequence databanks. I. Heat-shock and glucocorticoid control elements in eukaryotic promoters, *Comput Appl Biosci* 1 [2], Seite 95-104.
- [211] Okret, S.; Poellinger, L.; Dong, Y. und Gustafsson, J. A. (1986): Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, Seite 5899-903.
- [212] Tanaka, H.; Dong, Y.; Li, Q.; Okret, S. und Gustafsson, J. A. (1991): Identification and characterization of a cis-acting element that interferes with glucocorticoid-inducible activation of the mouse mammary tumor virus promoter, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, Seite 5393-7.
- [213] Nishio, Y.; Isshiki, H.; Kishimoto, T. und Akira, S. (1993): A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction, *Mol Cell Biol* 13, Seite 1854-62.
- [214] Chan, G. C.; Hess, P.; Meenakshi, T.; Carlstedt-Duke, J.; Gustafsson, J. A. und Payvar, F. (1991): Delayed secondary glucocorticoid response elements. Unusual nucleotide motifs specify

glucocorticoid receptor binding to transcribed regions of alpha 2u-globulin DNA, J Biol Chem 266, Seite 22634-44.

[215] Karin, M.; Haslinger, A.; Holtgreve, H.; Richards, R. I.; Krauter, P.; Westphal, H. M. und Beato, M. (1984): Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene, Nature 308, Seite 513-9.

[216] Schooltink, H.; Schmitz-Van de Leur, H.; Heinrich, P. C. und Rose-John, S. (1992): Up-regulation of the interleukin-6-signal transducing protein (gp130) by interleukin-6 and dexamethasone in HepG2 cells, FEBS Lett 297 [3], Seite 263-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1544406>

[217] Varma, V. K.; Smith, T. K.; Sorci-Thomas, M. und Ettinger, W. H., Jr. (1992): Dexamethasone increases apolipoprotein A-I concentrations in medium and apolipoprotein A-I mRNA abundance from Hep G2 cells, Metabolism 41 [10], Seite 1075-80. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1328818>

[218] Levy, J. R.; Krystal, G.; Glickman, P. und Dastvan, F. (1991): Effects of media conditions, insulin, and dexamethasone on insulin- receptor mRNA and promoter activity in HepG2 cells, Diabetes 40 [1], Seite 58-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=1849849>

[219] Kancha, R. K. und Hussain, M. M. (1996): Up-regulation of the low density lipoprotein receptor-related protein by dexamethasone in HepG2 cells, Biochim Biophys Acta 1301 [3], Seite 213-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8664331>

[220] Diederich, M.; Wellman, M. und Siest, G. (1994): Localization of a regulatory region on the 5'-untranslated region of human hepatoma HepG2 gamma-glutamyltransferase mRNA and response to dexamethasone and antisense oligonucleotide treatment, FEBS Lett 356 [2-3], Seite 307-10. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=7805861>

[221] Waite, K. A. und Eng, C. (2003): From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family, Nat Rev Genet 4 [10], Seite 763-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14526373

[222] Dennler, S.; Itoh, S.; Vivien, D.; ten Dijke, P.; Huet, S. und Gauthier, J. M. (1998): Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene, Embo J 17, Seite 3091-100.

[223] Chen, X.; Rubock, M. J. und Whitman, M. (1996): A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling [published erratum appears in Nature 1996 Dec 19-26;384(6610):648], Nature 383, Seite 691-6.

[224] Massague, J. und Chen, Y. G. (2000): Controlling TGF-beta signaling, Genes Dev 14, Seite 627-44.

- [225] Gorelik, L.; Fields, P. E. und Flavell, R. A. (2000): Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression, *J Immunol* 165 [9], Seite 4773-7.
- [226] Wotton, D.; Lo, R. S.; Lee, S. und Massague, J. (1999): A Smad transcriptional corepressor, *Cell* 97 [1], Seite 29-39.
- [227] Akiyoshi, S.; Inoue, H.; Hanai, J.; Kusanagi, K.; Nemoto, N.; Miyazono, K. und Kawabata, M. (1999): c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads, *J Biol Chem* 274 [49], Seite 35269-77.
- [228] Miyazono, K.; ten Dijke, P. und Heldin, C. H. (2000): TGF-beta signaling by Smad proteins, *Adv Immunol* 75, Seite 115-57.
- [229] Zawel, L.; Yu, J.; Tarrance, C. J.; Markowitz, S.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. und Zhou, S. (2002): DEC1 is a downstream target of TGF-beta with sequence-specific transcriptional repressor activities, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [5], Seite 2848-53.
- [230] Jardine, H.; MacNee, W.; Donaldson, K. und Rahman, I. (2002): Molecular mechanism of TGF-beta {sub1}-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells: involvement of AP-1/ARE and Fra-1, *J Biol Chem* 23, Seite 23.
- [231] Grimes, H. L.; Chan, T. O.; Zweidler-McKay, P. A.; Tong, B. und Tschlis, P. N. (1996): The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal, *Mol Cell Biol* 16 [11], Seite 6263-72.
- [232] Wang, T.; Zou, J.; Cunningham, C. und Secombes, C. J. (2002): Cloning and functional characterisation of the interleukin-1 beta 1 promoter of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Biochim Biophys Acta* 1575 [1-3], Seite 108-16.
- [233] Brehm, A. und Kouzarides, T. (1999): Retinoblastoma protein meets chromatin, *Trends Biochem Sci* 24 [4], Seite 142-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=10322419>
- [234] Brehm, A.; Miska, E. A.; McCance, D. J.; Reid, J. L.; Bannister, A. J. und Kouzarides, T. (1998): Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription, *Nature* 391 [6667], Seite 597-601. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9468139>
- [235] Kirov, N. C.; Lieberman, P. M. und Rushlow, C. (1996): The transcriptional corepressor DSP1 inhibits activated transcription by disrupting TFIIA-TBP complex formation, *Embo J* 15 [24], Seite 7079-87. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9003783>
- [236] Lehming, N.; Thanos, D.; Brickman, J. M.; Ma, J.; Maniatis, T. und Ptashne, M. (1994): An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor, *Nature* 371 [6493], Seite 175-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8072548>
- [237] Nakao, A.; Afrakhte, M.; Moren, A.; Nakayama, T.; Christian, J. L.; Heuchel, R.; Itoh, S.; Kawabata, M.; Heldin, N. E.; Heldin, C. H. und ten Dijke, P. (1997): Identification of Smad7, a

- TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling, Nature 389 [6651], Seite 631-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9335507>
- [238] Nakao, A.; Okumura, K. und Ogawa, H. (2002): Smad7: a new key player in TGF-beta-associated disease, Trends Mol Med 8 [8], Seite 361-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=12127716>
- [239] Berk, A. J. (1989): Regulation of eukaryotic transcription factors by post-translational modification, Biochim Biophys Acta 1009 [2], Seite 103-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=2529903>
- [240] Beckett, D. (2001): Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation, J Mol Biol 314 [3], Seite 335-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11846548>
- [241] Yu, B. und Wright, S. D. (1996): Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14, J Biol Chem 271 [8], Seite 4100-5.

Abkürzungsverzeichnis

APP	acute phase protein
ARE	activin response element
Ak	Antikörper
AML1	acute myeloid leukemia 1
AP-1	activator protein-1
APR	Akutphasereaktion
β -Gal	β -Galaktosidase
BMP	bone morphogenetic protein
BPI	bactericidal/permeability increasing protein
BSA	bovine serum albumin
bZIP	basic region leucine zipper
C/EBP	(C)CAAT/enhancer binding protein
Caspase	cystein aspartate protease
CD	cluster of differentiation
CETP	cholesterol ester transfer protein
CMV	Cytomegalovirus
CPM	counts per minute
CR	complement receptor
CRP	C-reactive protein
CS	consensus sequence
CTF	CCAAT-box transcription factor
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELAM	endothelial cell-leukocyte adhesion molecule
ELAV	embryonic lethal abnormal visual
ELISA	enzyme-linked immunosorbent-assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ETS	E26-transformation-specific
FACS	fluorescence activated cell sorter
FAST-1	forkhead activin signal transducer-1
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Gfi-1	growth factor independence-1
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI (-Anker)	Glycophosphatidylinositol (-Anker)
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	glucocorticoid responsive element
HDL	high density lipoproteine
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
ICE	IL-1 converting enzyme
IFN- γ	Interferon γ
I κ B	inhibitor kappa B
IL	Interleukin
IL-1RA	IL-1 Rezeptorantagonisten
IL-1R-AcP	IL-1 accessory protein
IL-1RI	IL-1 Rezeptor I
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun-NH2-terminal kinase
LB	Luria-Bertani (Medium)
LBP	Lipopolysaccharid Bindendes Protein
LIF	leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucine rich repeats
LTA	Lipoteichonsäuren
MAP	mitogen activated protein
MEM	minimal essential medium
MKKK	MAP Kinase Kinase Kinase
mRNA	messenger-RNA
NF-1	nuclear factor 1
NF-IL6	nuclear factor IL-6
NF- κ B	nuclear factor kappa B
nGRE	negativ GRE
OSM	Oncostatin M
PAA	Polyacrylamid
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGN	Peptidoglykan
pGRE	positiv GRE

PIC	preinitiation complex
PLTP	Phospholipid Transfer Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	pattern-recognition receptor
RLA	relative Luciferaseaktivität
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	respiratory syncytial virus
SAA	Serum Amyloid A
SBE	Smad binding elements
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Reaktions-Syndrom
Smad	aus sma (C. elegans-Gen) und Mad (mothers against dpp, Drosophila-Gen)
SNAG	Snail/Gfi-1
SP-1	specificity protein-1
Stat	signal transducer and activator of transcription
TAF	TBP-associated factors
TBP	TATA-box binding protein
TF	Transkriptionsfaktor
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
TLR	toll-like receptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor- α
TNFR	TNF-Rezeptor
Tyk	Tyrosinkinase
UTR	untranslated region

Publikationen

Hallatschek W, Fiedler G, Kirschning CJ, Creutzburg F, Lamping N, Nussler A, Schumann RR. Inhibition of hepatic transcriptional induction of lipopolysaccharide-binding protein by transforming-growth-factor beta1. *Eur J Immunol.* 2004 May; 34(5): 1441-50

Opitz B, Schroeder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W, Zahringer U, Hartung T, Gobel UB, Schumann RR. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22; 276(25): 22041-7

Lamping N, Dettmer R, Schroeder NW, Pfeil D, Hallatschek W, Burger R, Schumann RR. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest.* 1998 May 15; 101(10): 2065-71

Kirschning CJ, Unbehaun A, Fiedler G, Hallatschek W, Lamping N, Pfeil D, Schumann RR. The transcriptional activation pattern of lipopolysaccharide binding protein (LBP) involving transcription factors AP-1 and C/EBP beta. *Immunobiology.* 1997 Dec; 198(1-3): 124-35

Hallatschek W, Unbehaun A, Kirschning CJ, Creutzburg F, Schumann RR. Mechanisms of Transcriptional Regulation of LPS Binding Protein (LBP) by Dexamethasone. Eingereicht

Hallatschek W, Creutzburg F, Moroy T, Schumann RR. Gfi-1 Binding Sites mediate inhibitory effect of TGF-beta1 on LBP promoter activity. Eingereicht

Kongressbeiträge

W. Hallatschek, G. Fiedler, and R. R. Schumann. TGF-beta1 Inhibits Induction of Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP). Jahrestagung der American Society of Microbiology (A.S.M.), Orlando, 2001

W. Hallatschek, A. Unbehaun, F. Creutzburg, and R.R. Schumann. Transcriptional Regulation of LPS Binding Protein (LBP) by Glucocorticoids Involves two Distinct Mechanisms. 6. Tagung der Intern. Endotoxin Society (IED), Paris, 2000

W. Hallatschek, F. Creutzburg, G. Fiedler and R.R. Schumann. Molecular Mechanisms of TGF-beta-Induced Down-Regulation of LPS Binding Protein (LBP) Promoter Activity. 5th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis, München, 2000

W. Hallatschek, G. Fiedler, R. R. Schumann. Transcriptional Inhibition of Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein (LBP) by TGF-beta. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 1999, Berlin

W. Hallatschek, G. Fiedler, J. Asmar, N. Lamping, R. R. Schumann. TGF-beta Blocks the Acute-Phase Transcriptional Activation of LBP in Humane Hepatoma Cells. 9th European Students Conference for Medical Students and Young Doctors, Charité, Berlin, 1998

W. Hallatschek, G. Fiedler, A. Unbehaun, J. Asmar, N. Lamping, and R.R. Schumann. Transcriptional Regulation of the Acute Phase Protein Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP) by pro-inflammatory cytokines, TGF-beta, and involving the transcription factor NF-IL6. 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Berlin, 1998

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Werner Hallatschek
Geburtsdatum	03.10.61
Geburtsort	Öhringen, Baden Württemberg
Staatsang.	deutsch
Kind	Milos Hallatschek, geboren am 16.9.1988

Schulbildung, Berufsausbildung, Zivildienst

1968 - 79	Schiller Grundschule und Realschule Öhringen
1979 - 83	Ausbildung als Energieanlagenelektroniker, Energieversorgung Schwaben
1983 - 85	Leistung des Wehersatzdienstes in der Altenpflege, Würzburg
1985 - 88	Berlin-Kolleg, Institut zur Erlangung der Hochschulreife, Berlin

Studium

1988 - 95	Studium der Biologie an der FU Berlin mit Diplomabschluss
1994 - 95	Experimentelle Diplomarbeit im Institut für Angewandte Genetik, FU. Thema: Inkorporation viraler Gene in Raps mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens zur Erzeugung von Resistenz gegen das Wasserrübenvergilbungs-Virus
1995 - 96	Wissenschaftliche Mitarbeit im Institut für Angewandte Genetik, FU Berlin

Doktorarbeit, Berufstätigkeit, Weiterbildung

1996 - Jan 02	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Ralf R. Schumann, bis 4/98 am MDC für Molekulare Medizin in Berlin-Buch, danach Charité, Institut für Mikrobiologie. Erstellung der experimentellen Doktorarbeit.
Feb 02 - Nov 02	Ausbildung zum Assistent für Bioinformatik, C & Q Bildungszentrum Haberhauffe, Berlin
seit Dez 02	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, AG Schumann, Charité, Berlin

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ralf R. Schumann für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Sicherung der finanziellen Seite, für die Möglichkeit zu eigenständigem Arbeiten, für die jederzeit positive Einstellung zu meiner Arbeit und nicht zuletzt für die Möglichkeit, in- und ausländische Kongresse zu besuchen.

Ebenso danke ich Prof. Lucius für die Vertretung meiner Arbeit in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I.

Danke allen Mitglieder der Arbeitsgruppe Schumann für das (fast) immer hervorragende Arbeitsklima und für die großen und kleinen Hilfestellungen, Anregungen, Diskussionsbeiträge und alles, was dazugehört. Ganz besonders danke ich dabei Fränzi Creuzburg, mit der ich all die Jahre ganz hervorragend zusammen gearbeitet habe. Besonderen Dank auch an Bastian Opitz, Michaela Müller, Marcel Berger, Christiane Läßle, Jasmin Asmar und Na-Ri Oh. Mein Dank auch Norbert Lamping, Anett Unbehauen, Nicole Siegemund und der leider verstorbenen lieben Kollegin Dr. Dagmar Pfeil.

Ferner gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie, Charité, in dem der größte Teil der Arbeit durchgeführt wurde, für die gewährte freundliche Unterstützung.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.

Werner Hallatschek